



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO**

**AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITARIA POLICLINICO "P. GIACCONE"**

**DIPARTIMENTO BIOMEDICO DI MEDICINA INTERNA E SPECIALISTICA (DiBiMiS)**

**DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA E DIAGNOSTICA IN MEDICINA INTERNA**

**INDIRIZZO: FISIOPATOLOGIA DELLE MALATTIE DEL FEGATO**

**XXVI CICLO SSD (MED 08)**

*(Coordinatore: Prof. P. Almasio)*

---

# Identificazione di nuovi bersagli terapeutici nel microambiente nei Linfomi T Epatosplenici

**TESI DI:**

*Dott. Alessandro Gulino*

**RELATORE:**

*Chiar.ma Prof.ssa Ada Maria Florena*

**CO-RELATORE:**

*Prof. Claudio Tripodo*

**COORDINATORE:** *Prof. P. Almasio*

**Anno Accademico 2015/2016**

## INDICE

Introduzione.....	3
Materiali e Metodi.....	6
Scelta dei casi.....	6
Tissue Micro Array.....	6
Immunoistochimica.....	7
Protocollo Immunoistochimica.....	8
Citofluorimetria.....	10
Colture Cellulari.....	10
Sorting Immunomagnetico.....	12
Saggio di Vitalità.....	12
Anticorpi.....	13
Dischetti di Acido Ialuronico (HA-EDA).....	14
Modello Xenograft.....	14
Risultati e Discussione.....	15
Conclusioni.....	32
Ringraziamenti.....	34
Bibliografia.....	36



## Introduzione

Con il termine “linfoma” s’indica un gruppo eterogeneo di tumori che originano dai linfociti, le principali cellule del sistema immunitario. Gli organi maggiormente interessati dal processo linfomatoso sono in genere i linfonodi, che possono essere considerati come degli aggregati di tessuto linfatico presenti in tutto il corpo. Dai linfonodi la malattia può diffondersi, attraverso il sangue e/o i vasi linfatici, ad altri linfonodi ed organi, sia linfatici (midollo osseo, milza), sia extralinfatici (cute, polmoni, SNC, stomaco, fegato), in alcuni casi la neoplasia può interessare il tessuto linfoide associato alle mucose, ad esempio la mucosa intestinale (MALT). I linfociti hanno il compito fisiologico di circolare nel sangue e in tutti gli altri organi del corpo, alla ricerca di antigeni estranei da eliminare. La controparte tumorale in genere risulta incapace di espletare tale funzione, determinando così una progressiva compromissione del sistema immunitario dell’ospite. Nella stragrande maggioranza dei casi le cause dello sviluppo di un clone linfomatoso non sono conosciute. Tuttavia, anche nei linfomi, trova riscontro l’assioma di una cancerogenesi su basi genetiche, che implica l’acquisizione, da parte dei linfociti, di un fenotipo maligno caratterizzato da autonomia replicativa ed inibizione dei meccanismi di morte cellulare programmata. Le condizioni predisponenti allo sviluppo di un linfoma sono molteplici e comprendono malattie congenite (es. Wiskott Aldrich Syndrome), malattie autoimmuni (es. Sindrome di Sjogren, malattia celiaca) o stati di immunodeficienza acquisita (AIDS). Tuttavia, a causa del continuo e progressivo aumento dell’incidenza dei linfomi a livello mondiale, una migliore caratterizzazione delle condizioni predisponenti e degli eventi genetici causali di queste neoplasie è da considerarsi di assoluta necessità. Più dell’85% dei linfomi dell’adulto origina dai linfociti B a diverso grado di maturazione mentre solo una piccola percentuale origina dai linfociti T. La bassa incidenza di questi ultimi e la minore caratterizzazione del sistema T- cellulare rispetto a quello B rendono l’approccio ai linfomi T problematico. I linfomi sono suddivisi storicamente in due grandi categorie: Linfomi Non-Hodgkin e Linfomi di Hodgkin. Questi ultimi sono istologicamente caratterizzati dalla presenza delle cellule di Reed-Sternberg, e prendono il nome dal medico che per primo, nel 1832, ne descrisse le caratteristiche istopatologiche. Alle manifestazioni cliniche più frequenti, quali l’aumento di dimensioni di una o più stazioni linfonodali (cervicali, del cavo ascellare e della regione inguinale), si associano sintomi come la febbre, astenia, sudorazione notturna, prurito, diminuzione del peso corporeo non altrimenti spiegabile. Più raramente si riscontra il coinvolgimento di organi non linfatici. Tuttavia bisogna tenere presente che tali sintomi non sono esclusivamente presenti nell’ambito dei linfomi bensì caratteristici di molte altre patologie.

La diagnosi di linfoma viene effettuata mediante esame istologico del linfonodo, prelevato mediante biopsia. A volte è necessario ricorrere anche alla biopsia di altri organi, quali il midollo

emopoietico, per valutare la diffusione del clone neoplastico nell'organismo ed effettuare la stadiazione.

Ai linfomi Non-Hodgkin appartengono i linfomi a cellule T periferiche (PTCL)[1]. I PTCL rappresentano circa il 12% di tutte le neoplasie linfoidi nei paesi occidentali. Essi mostrano una prevalenza endemica in alcune aree geografiche quali Giappone, bacino dei Caraibi e USA; nei paesi asiatici, in cui c'è una condizione endemica d'infezione da HTLV-1 (Human T-cell Leukemia Virus Type -1), la percentuale dei PTCL è più elevata [2].

I PTCL derivano da cloni linfocitari T o NK e secondo la vigente classificazione WHO, vengono classificati in forme specifiche ed in forme non altrimenti specificabili (PTCL-NOS) che rappresentano il 50% di questi tumori. Entrambi i gruppi di PTCLs mostrano un esito clinico sfavorevole, una scarsa risposta ai tradizionali approcci chemioterapici, e ad oggi mancano di adeguate terapie target mirate. Le forme specifiche e più rare comprendono patologie quali, il linfoma/leucemia T dell'adulto (ATLL), il linfoma anaplastico a grandi cellule T (ALCL), nelle sue due varianti ALK- positive ed ALK-negative, il linfoma T/NK nasal-type, il linfoma T angioimmunoblastico (ATLL), ed i linfomi a cellule T  $\gamma\delta$  ( $\gamma\delta$  TCL). Quest'ultima categoria di PTCL, coniuga un'incidenza estremamente rara, una presentazione clinica spesso sfavorevole ed un decorso aggressivo che ne fanno una sfida sotto il profilo clinico e biologico.

I linfomi T  $\gamma\delta$  vengono classificati dal WHO in due gruppi: la forma epatosplenica (HSTL), e la forma cutanea primaria (PCGD-TCL) [3]. Il linfoma T  $\gamma\delta$  epatosplenico interessa usualmente giovani adulti di sesso maschile [4]. Una maggiore suscettibilità a questo tipo di neoplasie è osservato in pazienti con patologie infiammatorie intestinali, spesso affetti da morbo di Crohn, che hanno una storia clinica di trattamento con farmaci ad attività immunosoppressoria quale l'Infliximab, inibitore del TNF $\alpha$  [5].

Gli HSTLs derivano nel 95% dei casi da un sottoinsieme specifico di linfociti T che esprimono il recettore  $\gamma\delta$  (TCR) e nel 5% dei casi da linfociti T che mostrano una positività per il recettore  $\alpha\beta$  (TCR) [6;7], mostrano un comportamento molto aggressivo, una scarsa risposta ai regimi terapeutici standard ed una prognosi sfavorevole.

I cloni neoplastici sono rappresentati da una popolazione di cellule linfoidi di medie dimensioni, che mostra uno spiccato tropismo nei confronti del fegato, milza e midollo osseo [8]. L'approccio diagnostico all' HSTL presenta non poche difficoltà essendo la presentazione clinica comune ad altre patologie croniche con coinvolgimento epatico e splenico.[9]

I soggetti affetti dal linfoma T  $\gamma\delta$  epatosplenico, mostrano nelle fasi precoci della malattia, sintomi associabili ad altri disordini linfoproliferativi di tipo B (febbre, perdita di peso, sudorazione notturna, affaticamento e prurito) ed in una fase più tardiva, splenomegalia ed epatomegalia [7].

Splenomegalia ed epatomegalia non sono tuttavia dei caratteri distintivi del linfoma epatosplenico  $\gamma\delta$  e vengono condivise da altre patologie: quali infezioni batteriche o infestazioni (leishmaniosi o brucellosi), anemie emolitiche, neoplasie mieloproliferative, patologie autoimmuni (lupus eritematoso sistemico), patologie da accumulo (amiloidosi e la malattia di Gaucher). La mancanza di tratti clinici specifici è dunque uno dei motivi alla base della misinterpretazione della patologia al momento dell'esame obiettivo e che causa, il più delle volte, un ritardo nella diagnosi.

Il profilo immunologico dei linfomi T  $\gamma\delta$  epatosplenico vede una positività per il CD2, CD3 e CD7; una negatività per CD4, CD5 e CD57. Alcuni cloni neoplastici dal profilo citotossico mostrano l'espressione di marcatori (NK) quali CD16, CD57 ed una variabile espressione di CD8 [10]. Le anomalie genetiche tipiche di questo gruppo di linfomi sono: la presenza dell'isocromosoma 7, la trisomia 8 e la perdita del cromosoma Y [11].

Il sito preferenziale di localizzazione di questa tipologia di linfomi è quello della nicchia vascolare degli organi infiltrati, è a livello sinusoidale infatti, che il clone si localizza trovando probabilmente un microambiente idoneo al suo sviluppo. Questo comportamento peculiare lascia pensare che alla base dello sviluppo della patologia un ruolo fondamentale possa essere giocato da componenti microambientali vascolari che supportino la sopravvivenza del clone neoplastico. Il fatto che alle forme epatospleniche non si accompagni una marcata stromatogenesi, ha fatto sì che venisse negletto un ruolo attivo del microambiente stromale nella progressione di tale linfoma. Tuttavia, un'analisi più approfondita del cross-talk tra nicchia vascolare e clone tumorale gamma delta, potrebbe portare all'identificazione di nuovi potenziali target terapeutici da associare agli approcci terapeutici convenzionali.

Com'è noto, le nicchie vascolari sono caratterizzate dall'espressione di molecole di adesione (e.g. selectine, integrine, acido ialuronico) in grado di guidare l'homing leucocitario e di promuovere l'attivazione di cascate segnalatorie (a monte di PI3K e AKT) che favoriscono la sopravvivenza cellulare [12]. I linfociti gamma delta esprimono i recettori funzionali per molte delle molecole di adesione espresse dagli endoteli (CD44, PSGL-1 etc.), è presumibile quindi che l'interazione tra linfocita tumorale ed endotelio attivato, seguita dall'attivazione di pathways segnalatori anti-apoptotici, sia alla base dello spiccato tropismo mostrato dal linfocita neoplastico nei confronti del microambiente vascolare. Inoltre, le cellule reticolari presenti nei sinusoidi, sono in grado di secernere CXCL12, una chemochina coinvolta nella sopravvivenza delle cellule emopoietiche, che lega il recettore di membrana CXCR4 espresso sul linfocita gamma delta [13].

Alla luce di queste evidenze, appare d'interesse lo studio delle interazioni tra clone linfocitario T  $\gamma\delta$  e componenti microambientali stromali nel tentativo di individuare nuovi bersagli di terapie mirate, cercando non solo di valutare se esiste un effettivo rapporto tra le diverse componenti cellulari ma

anche quali potrebbero essere le conseguenze connesse all'interruzione del loro cross-talk.

## Materiali e Metodi

### Scelta dei Casi

Al fine di comprendere le dinamiche che stanno alla base del comportamento dei Linfomi a cellule T periferiche (PTCL), ho indagato l'espressione in situ, attraverso metodiche di immunoistochimica, di molecole (CD44 e PSGL-1) potenzialmente coinvolte nell'interazione tra clone neoplastico e componenti vascolari microambientali (Acido Ialuronico e P - E Selectine). L'espressione è stata valutata su una casistica, di 9 casi di Linfomi T Gamma Delta variante Epatosplenica (HSTL), 110 casi di Linfoma Anaplastico a Grandi Cellule T (PTCL) suddivisi in tre vetrini ottenuti mediante metodica Tissue Micro Arrays (TMA), ottenuti dal Prof. Pier P. Piccaluga del Dipartimento di Ematologia e Scienze Oncologiche "L. e A. Seràgnoli" dell'Università di Bologna e dall'Istituto di Anatomia Patologica dell' A.O.U.P. "Paolo Giaccone" di Palermo. In seguito abbiamo provveduto alla selezione di 50 casi di linfomi periferici a cellule T non altrimenti specificabili (PTCL-NOS), suddivisi in due vetrini di Tissue Micro Array (TMA), allo scopo di voler creare un'analisi comparativa di espressione del PSGL-1 e del CD44 nei due setting differenti.

### Tissue Micro Array

Il sistema Tissue Micro Array, è una metodica introdotta nel 1998, che consente di analizzare diversi campioni, provenienti da uno o più donatori, contemporaneamente sullo stesso vetrino [14]. I Tissue Micro Array vengono usati in immunoistochimica per poter studiare, attraverso l'uso di markers molecolari, l'espressione antigenica di tessuti appartenenti a pazienti diversi, utilizzando un solo preparato istologico.

L'analisi con Tissue Micro Array consta, di un prelievo di piccoli frammenti di tessuto "fissato" e incluso in paraffina con un sistema di "carotaggio" e il successivo allineamento di tali frammenti all'interno di un nuovo blocchetto di paraffina.

E' importante che i frammenti tissutali siano identificabili per poterli associare ai relativi dati di tipo patologico e clinico di ogni paziente. L'area più rappresentativa del tumore appartenente ad ogni singolo caso oggetto del nostro studio, è stato identificato su sezioni colorate con Ematossilina (HE), in modo da poter poi successivamente procedere alla costruzione del Tissue Micro Array (TMA). Dei cilindri dello spessore di 0,6 – 1,0 mm sono stati rimossi dalle regioni di interesse e inseriti in un recipiente di paraffina secondo un preciso ordine. Il nuovo blocchetto così ottenuto è

stato fatto raffreddare ed è poi stato tagliato per ottenere le sezioni utilizzate per l'analisi immunoistochimica.

## Immunoistochimica

Con il termine immunoistochimica (IHC) vengono indicate una varietà di metodiche che permettono l'identificazione e la localizzazione di componenti cellulari (antigeni) in sezioni tissutali, attraverso l'utilizzo di reazioni antigene – anticorpo. Le indagini IHC sono strumenti ormai irrinunciabili in diversi campi della diagnostica istopatologica, in quanto permettono di identificare nelle cellule recettori cellulari, fattori di crescita, citochine e modificazioni funzionali (induzioni enzimatiche), rendendo possibile l'individuazione di nuovi antigeni tumorali e la tipizzazione di neoplasie. Le metodiche di IHC possono essere dirette o indirette. Nelle metodiche dirette, l'anticorpo specifico è legato chimicamente con il marcatore e reagisce con l'antigene, consentendo una veloce e semplice esecuzione del test; in quelle indirette, l'anticorpo specifico riconosce l'antigene formando il complesso antigene – anticorpo, successivamente un altro anticorpo (anticorpo secondario) coniugato con marcatore, riconosce e lega il primo anticorpo.

E' importante ricordare che, per avvenire il riconoscimento tra i due anticorpi è necessario che la loro provenienza sia da specie diverse. Tra le metodiche indirette recenti possiamo annoverare sistemi che utilizzano strutture con immunocomplessi, e sistemi che sfruttano l'affinità tra biotina – streptavidina. L'assenza in questi sistemi di anticorpi coniugati direttamente ai marcatori conferisce a questi metodi, una sensibilità superiore a quella attribuita alle tecniche dirette, consentendo di amplificare il segnale emesso, ciò permette la rilevazione di piccole quantità di antigene con la stessa quantità di anticorpo.

Il vantaggio risulta evidente nei tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina dove può essere osservata una forte colorazione anche se parte dell'antigene è stato distrutto dalla fissazione e dalla processazione. Il legame dell'antigene con l'anticorpo può essere rivelato da fluorocromi o enzimi  $\beta$ -coniugati; nel primo caso l'anticorpo diretto contro l'antigene o l'anticorpo secondario è marcato con un fluorocromo ( isotiocinato di fluoresceina, rodamina, ficoeritrina), nel secondo caso il marcatore è costituito da un enzima (perossidasi, fosfatasi alcalina,  $\beta$ -galattosidasi) che in presenza di un opportuno substrato produrrà un precipitato colorato nel sito di reazione.

Ciascun metodo di rivelazione del segnale antigene – anticorpo presenta vantaggi e svantaggi che devono essere valutati prima della scelta della procedura, va sempre considerata l'affinità intrinseca di alcuni elementi cellulari e tissutali per i componenti della metodica, nonché la presenza all'interno di tessuti di pigmenti che possono confondersi con il cromogeno. Ad esempio i mastociti legano naturalmente la streptavidina, mentre fegato, rene, surrene, encefalo, mammella contengono

sostanze biotino-simili. Quest'ultimo inconveniente può essere risolto adoperando inibitori della biotina endogena, o un differente sistema di rivelazione.

La preparazione di sezioni sottili adatte alle colorazioni istochimiche, richiede che i campioni di tessuto fissati, vengano impregnati e rivestiti con un mezzo di inclusione fuso, che conferisce maggiore consistenza e resistenza, la paraffina. A partire dal pezzo incluso in paraffina si procede attraverso diverse fasi fino all'immunolocalizzazione dell'antigene prescelto. L'immunoistochimica è una procedura multistep le cui singole fasi sono riportate di seguito:

Ottenimento della sezione dal pezzo incluso; De-paraffinazione; Idratazione; Smascheramento antigenico; Blocco delle attività enzimatiche cellulari; Saturazione dei siti aspecifici; Reazione antigene anticorpo; Disidratazione; Diafanizzazione; Montaggio permanente del vetrino; Osservazione al microscopio.

Nella presente tesi, le reazioni di immunoistochimica sono state effettuate manualmente utilizzando i protocolli di smascheramento consigliati nel datasheet del produttore degli anticorpi e con sistema di rivelazione in AEC (3, Ammino -9 – Etilcarbazolo) e in DAB (Diamminobenzidina), cromogeni ampiamente utilizzati in Immunoistochimica.

## Protocollo di Immunoistochimica (IHC)

Tagliare al microtomo sezioni dello spessore di circa 3  $\mu\text{m}$ , porle in bagnetto a temperatura 45° per far distendere la paraffina, poi raccogliere le sezioni su vetrini trattati con Poly-L-lisina che garantisce la perfetta adesione della sezione.

Lasciare asciugare le sezioni per 16-18 ore a 37° per consentire la massima aderenza della sezione al vetrino porta oggetto.

Porre i vetrini in stufa a 95° per 5 minuti, poi in xilolo o altro agente de paraffinante sostitutivo.

Immergere i vetrini in maniera sequenziale in vaschette contenenti etanolo a concentrazione decrescente (100% , 95% , 75% ) mantenendoli per almeno 2 minuti in ognuna. Infine eliminare l'eccesso di etanolo ponendo i vetrini sotto acqua corrente ed effettuando un lavaggio in acqua distillata. Operando in tal senso, sono state reidratate le sezioni.

Lo smascheramento antigenico viene effettuato seguendo le indicazioni fornite sul datasheet del produttore dell'anticorpo che si vuole utilizzare. Tale procedura è necessaria a rompere i legami crociati formati dall'agente usato come fissativo. Soltanto pochi anticorpi non richiedono lo smascheramento, la maggior parte richiede smascheramento ad alta temperatura a pH 6 (Sodio Citrato) o pH 9 (TRIS- EDTA) eseguito in bagnetto termostato a 98°C.

Far raffreddare i vetrini nel loro stesso tampone , poi incubare con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% per 5 minuti al fine di inibire le perossidasi endogene. Lavare 2-3 volte in tampone PBS per circa 1 minuto.

Incubare le sezioni per 10 minuti con un agente a base di caseina 0,4 % che blocchi le interazioni di tipo elettrostatico o idrofobico fra antigeni aspecifici e il nostro anticorpo. In questo modo si evita di ottenere una colorazione aspecifica, che dà risultati falsi positivi difficili da distinguere al microscopio dai veri positivi. Lavare 2-3 volte in tampone PBS per circa 1 minuto.

Incubare le sezioni a 4° C over night, con l'anticorpo primario di nostra scelta. Lavare 2-3 volte in PBS per circa 1 minuto.

Legame dell'anticorpo secondario specifico per la porzione Fc dell'anticorpo primario mediante diversi metodi di rivelazione. In questa tesi si è utilizzato: il kit polimerico, costituito da post-primario, che amplifica il segnale dell'avvenuta reazione antigene-anticorpo per un tempo di 20 minuti, e da un polimero, costituito da un mix di immunoglobuline coniugate con enzima perossidasi di rafano, sempre per un tempo d'incubazione di 20 minuti; il link biotina-streptavidina coniugata con AP, che sfrutta la forte affinità fra queste due proteine per localizzare l'antigene di nostro interesse. In funzione del sistema di rivelazione utilizzato si possono avere diversi tipi di substrato cromogeni: per la perossidasi di rafano è stato usato il DAB, 3,3-diamminobenzidina tetraidrocloruro, che produce un'intensa colorazione marrone resistente all'alcool, e per la fosfatasi alcalina, AP, il Fast Red che produce un prodotto terminale insolubile di colore rosso.

Porre una goccia di AEC o DAB sulle sezioni lasciando agire finché al microscopio lo sviluppo della colorazione non raggiunge l'intensità desiderata. Bloccare la reazione immergendo i vetrini in acqua distillata.

Porre una goccia di Ematossilina di Mayer sui vetrini lasciando agire per 1-5 minuti e lasciare differenziare in acqua corrente. Otterremo così la colorazione blu nucleare che contrasta la colorazione rosso solubile prodotta dal cromogeno AEC, o quella marrone del DAB, che identifica gli antigeni.

Immergere in maniera sequenziale i vetrini in vaschette contenenti etanolo a concentrazione crescente (75 %, 95 %, 100 %) mantenendoli per almeno 2 minuti in ognuna. In questo modo le sezioni sono state disidratate.

Diafanizzare le sezioni immergendo i vetrini in xilolo per 5-10 minuti.

Mettere sui vetrini copri-oggetto una goccia di balsamo di Canada (montante permanente), far aderire bene il vetrino copri-oggetto evitando di creare bolle d'aria.

Far asciugare i vetrini in stufa a 95° C per circa 15 minuti. I vetrini sono ora pronti per l'osservazione al microscopio.

Per verificare la validità del metodo e l'attendibilità del risultato della reazione immunoistochimica è necessario sottoporre alla medesima fissazione e processazione due campioni che fungono da controllo positivo e negativo. Il controllo positivo è costituito da una sezione di tessuto che esprime

sicuramente l'antigene specifico riconosciuto da un anticorpo dando una reazione positiva; se in questo controllo non avviene la reazione di colorazione, tutte le altre sono da considerare nulle.

Il controllo negativo può essere rappresentato da una sezione tissutale non trattata con l'anticorpo primario che, viene sostituito con IgG di siero normale di topo; la presenza di positività in questo controllo indica che la reazione è aspecifica.

## CITOFLUORIMETRIA (CFM)

E' una tecnica che consente l'analisi automatica di sospensioni cellulari monodisperse, misurandone le caratteristiche fisiche e biochimiche all'interno di un flusso laminare che interseca una sorgente di eccitazione. E' possibile acquisire e memorizzare più parametri per ogni cellula misurata, (Volume; Granulosità; Fluorescenze), utilizzando diverse finestre elettroniche di analisi su determinate popolazioni, discriminate secondo diversi parametri. Le cellule forzate ad allinearsi, attraversano individualmente un punto di misura, dove interagiscono con il raggio luminoso del sistema di eccitazione. Da questa interazione per fenomeni di diffrazione, rifrazione e riflessione, vengono generati dei segnali, raccolti da un sistema di lenti, specchi diecrici e filtri ottici ed inviati ai relativi sensori (Fotomoltiplicatori) che ne misurano l'ampiezza. Molte molecole biologiche di significato antigenico o recettoriale, posizionate sulla membrana plasmatica, nel nucleo, nel citosol, possono venire identificate con ligandi fluorescenti o con specifici MoAb marcati con fluorocromi. Il Citofluorimetro utilizzato è il **FACSCalibur System della BD**.

Gli esperimenti di colture cellulari e di lettura al Citofluorimetro sono stati eseguiti presso i Laboratori dell'Unità Operativa Complessa CLADIBIOR (Central Laboratory of Advanced Diagnosis and Biomedical Research), diretto dal Prof. Francesco Dieli, con l'ausilio del Dott. Marco Pio La Manna.

## Colture Cellulari

### **Huvec**

A seguito dell'isolamento di HUVEC dal funicolo ombelicale, le cellule vengono risospese nel terreno di coltura composto da: Medium 199 con Sali di Hank's (SIGMA), integrato con 20% di NBCS (Gibco Invitrogen Corporation), 50µg/ml di fattore di crescita per le cellule endoteliali (EGF), 50 µg/ml di eparina di mucosa intestinale di maiale (SIGMA), 100U/ml di penicillina e 100µg/ml di streptomycin (SIGMA).

Successivamente vengono fatte aderire alla fiasca da 25cm<sup>2</sup>, precedentemente rivestita di gelatina bovina (SIGMA): in questo modo le cellule proliferano e formano un monostrato. Il terreno di crescita va cambiato totalmente (5ml per T25) ogni 2 giorni fino al raggiungimento della



confluenza. Quando le HUVEC hanno raggiunto la confluenza, le cellule vengono sottoposte a tripsinizzazione (Trypsina in rapporto 1:1 con il PBS), per formare una nuova subcultura. Nelle diverse piastre Petri (P100) allestite sono stati aggiunti 6 ml di terreno EGM-2 (Lonza) specifico per cellule Huvec. La stimolazione delle Huvec è stata fatta con 5ug/ml di LPS per 4 ore. Ottenute circa 50000 cellule Huvec disposte nei 4 pozzetti, come previsto nel disegno sperimentale, con il loro terreno di coltura EGM-2 (Lonza).

### **Linfociti T Gamma Delta ( $\gamma\delta$ )**

#### **ISOLAMENTO DEI LINFOMONOCITI PRELEVATI DAL SANGUE PERIFERICO (LMP)**

Materiale necessario per la raccolta del campione e per la procedura di isolamento:

Provette contenenti per esempio eparina, citrato, EDTA (volume delle provette da definire in relazione agli esperimenti pianificati); Soluzione di Ficoll-Hypaque; Phosphate-Buffer Solution (PBS) 1X pH7.4/1mM EDTA senza  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$  ;

Tubi per centrifuga con volume di 50 ml; Colorante Trypan blue; Medium di congelamento composto da: 90% siero fetale di bovino (FBS) + 10% dimetilsolfossido (DMSO); Una serie di vials.

Procedimento:

- 1) Effettuare il prelievo di sangue intero (generalmente 10 o 20 ml) da una vena periferica con provette contenenti litio-eparina rispettando gli standard di sterilità/asepsi;
- 2) Se possibile, effettuare le procedure di isolamento in tempi brevi o conservare il campione per breve periodo di tempo a temperatura di circa 4 °C procedendo al suo mescolamento continuo (attraverso rulli);
- 3) In laboratorio, diluire il sangue intero attraverso l'utilizzo di PBS 1X pH7.4 / 1mM EDTA senza  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$  rispettando un rapporto di 1:2;
- 4) Porre 10 ml di soluzione di Ficoll-hypaque in un tubo da centrifuga e stratificare su di questa 20 ml di sangue diluito utilizzando una pipetta pasteur;
- 5) Centrifugare la suddetta soluzione a 460 g per 30 minuti a temperatura ambiente (questa manovra consentirà la formazione di anelli e l'individuazione di quello relativo ai LMP) (A);
- 6) Raccogliere con un'altra pipetta Pasteur l'anello relativo ai LMP (per tale operazione si consiglia di porre la punta della pipetta al di sopra dell'anello) (B);
- 7) Riporre l'anello dei LMP in nuovi tubi da 50 ml e procedere alla diluizione del contenuto con PBS 1X pH7.4/1mM EDTA fino al raggiungimento di un volume finale di 40 ml;

- 8) Mescolare per inversione;
- 9) Centrifugare a 250 g per 12 minuti alla temperatura di 4°C;
- 10) Eliminare il surnatante e riunire i due pellet in un unico tubo da 50 ml e aggiungere PBS 1X pH7.4/ 1mM EDTA fino a un volume finale di 40 ml;
- 11) Mescolare per inversione;
- 12) Centrifugare a 175 g per 12 minuti alla temperatura di 4°C;
- 13) Eliminare il surnatante e risospendere il pellet in 10 ml di PBS 1X pH7.4/1mM EDTA;
- 14) Prelevare circa 1 ml di sospensione cellulare e procedere con la conta in trypan blue.

#### **DESCRIZIONE DELLA CONTA CELLULARE:**

Preparare una camera di Neubauer con vetrino coprioggetto;

Prelevare 10 µl di Trypan blue (diluito 1:2 in PBS), porli in una provettina e aggiungere 10 µl di sospensione cellulare;

Miscelare bene e porre 10 µl di questa soluzione nella camera di Neubauer. Contare solo le cellule vive cioè quelle non colorate. Contare almeno due quadranti.

Il numero di cellule si ricava applicando la seguente formula:  $N^{\circ} \text{ cells} = (N^{\circ} \text{ cells}/N^{\circ} \text{ quadranti}) \times 2 \times 10^4 \times \text{volume in cui sono risospese le cellule}$ .

- 15) Centrifugare a 110 g per 12 minuti alla temperatura di 4°C;
- 16) Eliminare il surnatante e risospendere il pellet nel medium di congelamento composto da: 90% siero fetale di bovino (FBS) + 10% dimetilsolfossido (DMSO);
- 17) Conservare le cellule a -80°C overnight e poi trasferirle in azoto liquido. Si consiglia di conservare un quantitativo di cellule pari a 10 milioni/vial. Tale procedura renderà possibile l'utilizzo delle suddette cellule per esperimenti successivi (estrazione degli acidi nucleici, proteine, esperimenti con colture cellulari).

Dai LMP prelevati dal sangue intero è possibile effettuare successivamente l'isolamento delle **sottopopolazioni linfocitarie** (Th1, Th2 etc.) attraverso varie metodiche (per esempio metodiche di sorting immunomagnetico) e seguendo le procedure riportate dalle ditte produttrici dei kit di isolamento.

#### **Sorting Immunomagnetico Linfociti T Gamma Delta ( $\gamma\delta$ )**

I linfociti T Gamma Delta ( $\gamma\delta$ ) sono stati isolati dalla frazione di cellule mononucleate attraverso l'utilizzo del sistema di separazione Miltenyi, Kit isolamento TCR gamma delta con selezione immunomagnetica della Miltenyi (Miltenyi Biotec; Bergish Gladblach, Germany). Tale sistema utilizza colonne immunomagnetiche, che consentono recuperi fino all'85% e un livello di

purificazione intorno al 95%. Attraverso questa metodica sono stati recuperati  $250-300 \times 10^5$  linfociti T Gamma Delta ( $\gamma\delta$ ), posti in coltura in 1 ml di terreno RPMI (1640) e inseriti negli appositi pozzetti come previsto nel disegno sperimentale.

## Saggio di Vitalità

### **FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I ( BD Biosciences).**

FITC annessina V è utilizzato per determinare quantitativamente la percentuale di cellule in una popolazione sottoposta attivamente a morte cellulare per apoptosi. Essa si basa sulla proprietà che hanno le cellule, nel perdere la regolare simmetria della loro membrana, durante le prime fasi dell'apoptosi. Nelle cellule apoptotiche, la fosfatidilserina (PS), della membrana fosfolipidica si trasferisce dal foglietto interno della membrana plasmatica al foglietto esterno, esponendo così PS all'ambiente esterno. Annessina V è una proteina di legame calcio-dipendente che ha un'alta affinità per la fosfatidilserina (PS), ed è utile per identificare cellule apoptotiche con PS esposta. Ioduro di propidio (PI) è una sonda standard utilizzata in citometria a flusso per distinguere cellule vitali da cellule non vitali. Cellule vitali con membrana ancora intatta escludono PI, mentre le membrane delle cellule morte e danneggiate sono permeabili a PI. Le cellule che risultano positive per FITC Annessina V e negativo per PI sono in fase di apoptosi. Le cellule che risultano positive sia per FITC Annessina V e PI sono in necrosi o in una fase di apoptosi tardiva. Le cellule che non si colorano per FITC Annessina V e PI sono vive e in una fase di apoptosi non valutabile.

### **Protocollo Saggio di Vitalità**

1. Lavare le cellule due volte con PBS freddo e poi risospendere le cellule in 1X Binding Buffer ad una concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule / ml.
2. Trasferire 100 microlitri della soluzione ( $1 \times 10^5$  cellule) in una provetta 5 ml.
3. Aggiungere 5 ml di FITC Annessina V e 5 ml di Ioduro di Propidio (PI) .
4. Vortex delicatamente le cellule e incubare per 15 min a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) al buio.
5. Aggiungere 400 ml di 1X Binding Buffer a ciascuna provetta. Analizzare tramite citometria a flusso entro 1 ora.

## Anticorpi per Flow Cytometry

PE Mouse anti-Human IL17A Clone SCPL 1362; 100 Tests. Azienda BD Biosciences.

FITC Mouse anti-human CD69 Clone FN50 ; 30Tests. Azienda Miltenyi Biotec.

APC Mouse anti-human TCR Gamma Delta Clone B1; 25 microgrammi. Azienda BD Biosciences.

PE Mouse anti-human Osteopontin Clone#223126; 100 Tests. Azienda R&D Systems.

PE Mouse anti-human Ki-67 Clone (Mib-1). Azienda BioLegend.

## Anticorpi per Immunoistochimica

CD44 (H-CAM) Mouse anti-human Clone DF1485; Azienda Leica Novocastra

CD162 (PSGL-1) Mouse anti-human Clone 3E2.25.5(PL1); Azienda Leica Novocastra

CD30 Mouse anti-human Clone 15B3; Azienda Leica Novocastra

IL17 Goat anti-human Catalog Number AF-317-NA

IL17A Receptor. Mouse anti-human Clone IMG49M4D2 Azienda R&D Systems.

## Dischetti Acido Ialuronico (HA)

### **HA-EDA produzione idrogel reticolato**

Il derivato dell'acido (HA) etilendiammina ialuronico (EDA) (25% in moli di funzionalizzazione) (270 kDa) è stato prodotto come riportato altrove [15]. Dopo il congelamento è stato purificato ed essiccato, il prodotto HA-EDA è stato poi sciolto in tampone fosfato di Dulbecco a pH 7,4 al 3% w / v e la dispersione è stata degassata sotto vuoto. E' stata eseguita una procedura di reticolazione chimica utilizzando la coppia 1-etil-3- (3-dimetilamminopropil) carbodiimmide (EDC) / N-Hydroxysuccinimide (NHS) come agenti reticolanti [16]. Dopo la reticolazione l'idrogel prodotto è stato lasciato fino a quando è stato formato un xerogel piatto, tagliato poi a dischetti di matrici circolari di 10 mm di diametro. I campioni sono stati sterilizzati tramite UV utilizzando una lampada di 125 watt e conservati fino al momento dell'uso. Prima di essere messi in coltura, come previsto nel disegno sperimentale, sono stati collocati in PBS over-night ad idratare.

I dischetti di Acido Ialuronico sono stati prodotti dal Dott. Fabio Salvatore Palumbo, PhD del Laboratorio di Polimeri Biocompatibili del Dipartimento STEBICEF dell'Università degli Studi di Palermo diretto dalla Professoressa Giovanna Pitarresi, con cui da qualche anno collaboriamo.

## Modello Xenograft (Nu/Nu) Human ALCL

### **Culture Linee Cellulari Linfoma Anaplastico a Grandi Cellule T (ALCL).**

#### **Linea KARPASS 299**

Cellule di Linfoma Non-Hodgkin appartenenti ad un paziente di 25 anni, diagnosticato nel 1986, ora classificati come CD30+ Linfoma Anaplastico a Grandi Cellule T (ALCL), esprimono il gene di fusione NPM-ALK. Depositante Dr. A. Karpas, University of Cambridge, Cambridge, Regno Unito. Cellule dalla morfologia tonda poligonale, che crescono sole o in piccoli gruppi in sospensione.[17]

Le cellule sono state poste in coltura con il 90% di RPMI1640 e il 10% di FBS, con una

concentrazione cellulare di  $1,0-2,0 \times 10^6$  cellule / ml; successivamente vengono splittate 1:3 ogni 2-3 giorni per 6 giorni a 37° con il 5% della densità massima di CO<sub>2</sub> a ca.  $2-3 \times 10^6$  cellule / ml.

### **Linea SU-DHL 1**

Cellule di Linfoma Anaplastico a Grandi Cellule T (ALCL), appartenenti ad un ragazzo di 10 anni, diagnosticato nel 1973 come Linfoma Diffuso Istiocitico nell'1989 classificato dall'OMS in Linfoma Anaplastico a Grandi Cellule T (ALCL). Esprimono il gene di fusione NPM-ALK. Depositante Dr. J. Minowada, Cell Center Fujiaki, Okayama, Giappone. Cellule polimorfe, che crescono sole o in piccolo gruppi in sospensione [18]

Le cellule sono state poste in coltura con il 90% di RPMI1640 e il 10% di FBS, con una concentrazione cellulare di  $0,3-1 \times 10^6$  cellule / ml; successivamente vengono splittate 1:2 ; 1:3 ogni 2-3 giorni per 6 giorni a 37° con il 5% della densità massima di CO<sub>2</sub> a ca.  $1.5 \times 10^6$  cellule / ml.

### **Modello Xenograft (Nu/Nu) ALCL**

Il giorno prima dell'inoculo le cellule (KARPASS-299; SU-DHL-1) vengono splittate in modo da essere in una condizione replicativa ottimale e non in uno stato quiescente. Nel frattempo ai topi (Nu/Nu) femmine, fornite dalla (Charles River, Calco), vengono inoculati 500 microlitri di ascite (TMBeta1) a livello intraperitoneale in maniera da eliminare la popolazione linfocitaria T Natural Killer (NK).

Il giorno dell' inoculo sottocute le cellule sono recuperate, contate in doppio, separate e lavate 2x in PBS quelle necessarie vengono inoculate in 200 microlitri/topo nel fianco sinistro con siringa da insulina. Il monitoraggio della crescita è settimanale e misurato con calibro.

La crescita è considerata finita (per dimensione del nodulo, per stato di salute dell'animale o perchè non ci sono più variazioni) l'animale viene sacrificato e si prelevano gli organi secondo le finalità dell'esperimento. Gli organi prelevati sono Cuore; Polmone; Reni; Fegato; Milza; Linfonodi.

Gli organi prelevati sono stati etichettati con un codice corrispondente alla linea cellulare inoculata, gli organi con la sigla AD885 appartengono alla linea Tumorale SU-DHL-1; gli organi con la sigla AD886 appartengono alla linea tumorale Karpass 299.

Sui relativi organi è stata compiuta una valutazione morfologica attraverso la colorazione Ematossilina Eosina, seguita da una serie di indagini immunoistochimiche al fine di valutare l'espressione dei marcatori oggetto del nostro studio.

Modello sviluppato in collaborazione con l'Unità di Immunologia Molecolare della Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori di Milano, Diretta dal Dott. Mario Paolo Colombo.

## Risultati e Discussione

Il primo obiettivo del mio progetto di dottorato è stato quello di valutare l'espressione in situ, attraverso indagini di immunoistochimica, di recettori e ligandi potenzialmente coinvolti nell'interazione tra linfociti T ( $\gamma\delta$ ) e cellule stromali. Le molecole candidate per questa prima analisi di espressione sono, il CD44 (H-CAM) e il CD162 (PSGL-1), molecole costitutivamente espresse dalla superficie dei linfociti T gamma delta ( $\gamma\delta$ ) in grado di promuovere fenomeni di localizzazione, sopravvivenza e proliferazione.

CD44 è una proteina transmembrana di tipo 1, ha la funzione di principale molecola di adesione cellulare per l'acido ialuronico (HA) e di internalizzazione dello stesso [19]. Come tutte le proteine transmembrana, anche il CD44 è soggetto a glicosilazione, fosforilazione ed aggiunta di glicosamminoglicani. L'interazione tra acido ialuronico e CD44 influenza l'adesione ai componenti della matrice extracellulare ed è implicata nella stimolazione di aggregazione, proliferazione, migrazione cellulare e nell'angiogenesi [20].

Tutte queste proprietà biologiche sono essenziali nell'attività fisiologica delle cellule normali ma in

particolari condizioni sono associate ad attività patologiche ed inoltre possono essere messe in atto dalle cellule tumorali [21]. Il legame tra l'acido ialuronico e la molecola di adesione CD44 può dare inizio ad una serie di eventi che cominciano con modificazioni dell'aderenza alla matrice e proseguono con l'attivazione di altre molecole (quali fattori di crescita), degradazione della matrice stessa, angiogenesi, permeazione dei vasi, extravasazione [22]. Tutti questi steps sono necessari nell'iniziazione del processo di metastatizzazione [23;24]. Il CD44 non lega solamente HA: esso infatti ha capacità di legame anche verso fibronectine [25], verso la parte invariante delle MHC di classe II [26] e anche verso proteoglicani ad alto peso molecolare [27].

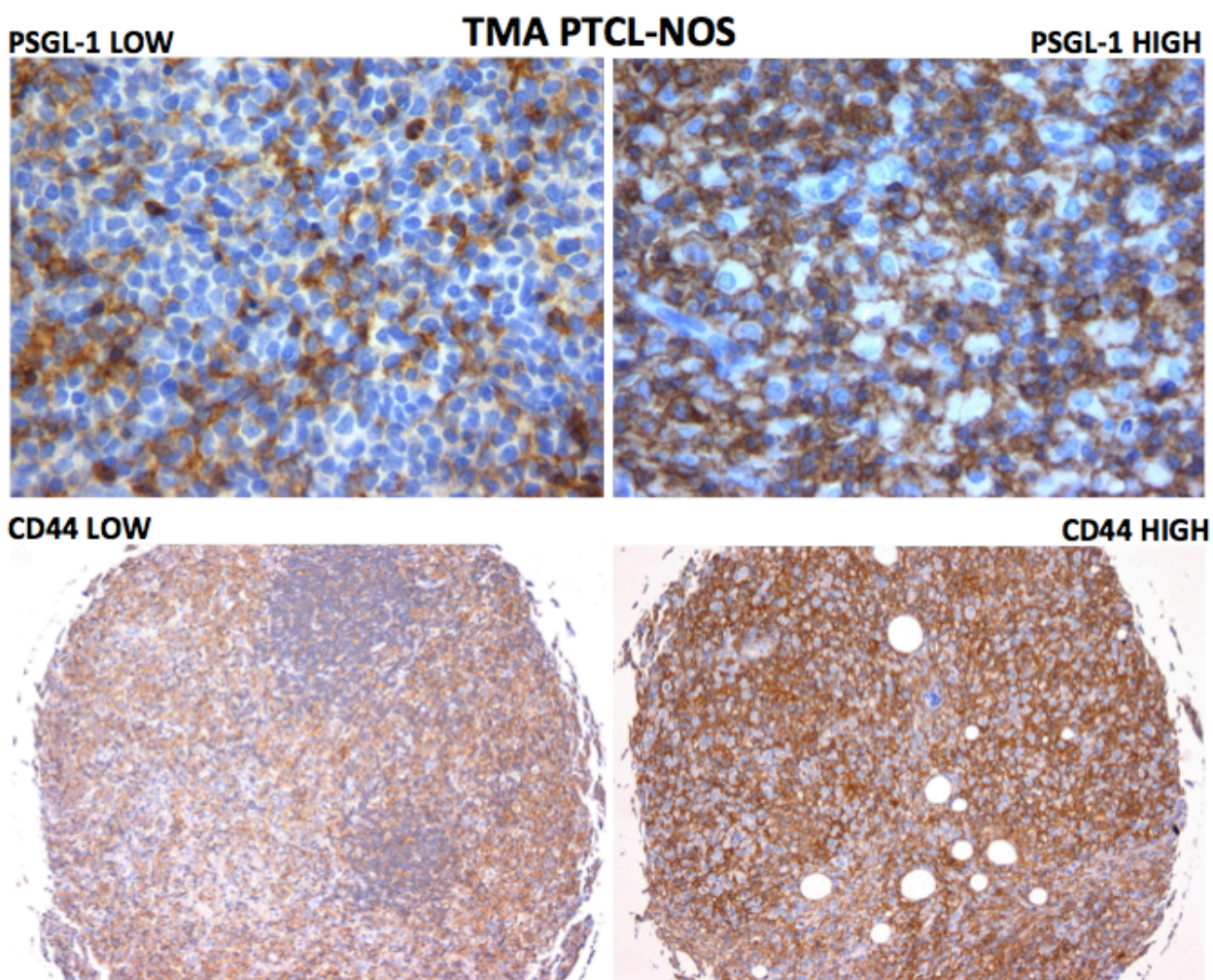
E' comunque dimostrato che, da un punto di vista oncologico, il CD44 abbia una notevole importanza nello studio della progressione e dell' invasività tumorale. Un tumore invasivo infatti, per espandersi, aggredisce la matrice extracellulare dei tessuti circostanti ed il CD44 insieme all'acido ialuronico hanno un ruolo sicuramente determinante nei vari pathways cellulari [28]. Il CD44 è coinvolto anche nel trasporto di linfociti circolanti ai linfonodi e nell'interazione linfocitica-epiteliale. Modula l'adesione e l'attivazione linfocitica, e il legame con HA, componente della matrice extracellulare può portare alla metastatizzazione [29]. Il CD44 è espresso anche sulla superficie delle cellule di pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (AML). Dagli studi effettuati sulla AML, si è vista la possibilità di ribaltare il blocco della differenziazione attraverso il legame di anticorpi specifici contro il CD44 [30].

PSGL-1 è una glicoproteina omodimerica di 240 KDa ca., costituita da due monomeri legati attraverso due ponti disolfuro. Ogni monomero possiede un epitopo tetrasaccaridico sialilato (SialylLewis x), un numero limitato di glicani N-linked sialilati e glicani O-linked [31]. Questa struttura chimica è tipica delle molecole leganti le Selectine, molecole di adesione espresse sulla membrana cellulare. La famiglia delle Selectine è costituita da tre proteine distinte, ma strettamente correlate che mediano l'adesione dei leucociti alle cellule endoteliali, ma anche i neutrofili circolanti, i monociti e linfociti attivati usano lo stesso meccanismo. PSGL-1 è infatti uno dei maggiori partners di legame della P-L ed E-selectina. Essa è normalmente espressa nei microvilli di leucociti polimorfonucleati, monociti, piastrine attivate, linfociti-T attivati, nelle plasmacellule normali e neoplastiche ed ha un ruolo nel regolare il trafficking delle componenti cellulari del sistema immunitario dal sangue periferico ai tessuti colpiti da infiammazione [31]. Accanto alla sua funzione adesiva cellula-cellula e cellula matrice, diverse osservazioni hanno portato a concludere che PSGL-1 possa agire come molecola capace di attivare pathways segnalatori intracellulari differenti [32]. E' dimostrato che il cross-linking di PSGL-1 in linfociti T attivati è in grado di indurre il processo di morte cellulare mediante induzione di apoptosi [33]; in cellule di linfoma T, PSGL-1 coadiuva il processo di metastatizzazione[34] ed sembra essere coinvolto nell'homing linfocitario, attraverso il suo legame con le chemochine CCL19 e CCL21[35]. Tra le altre funzioni del PSGL-1, scorrelate dal suo ruolo di ligando delle Selectine, vi è quella di recettore funzionale per l'Enterovirus 71 nei linfociti T [36].

Il ruolo del PSGL-1 quale possibile bersaglio di immunoterapia mediata da MoAb è stato indagato nel setting patologico del mieloma multiplo, dove è stato dimostrato che l'ingaggio del PSGL-1 sulla superficie delle plasmacellule neoplastiche, da parte di un MoAb specifico, è in grado di indurre morte cellulare via attivazione del Complemento, ADCC ed apoptosi [37].

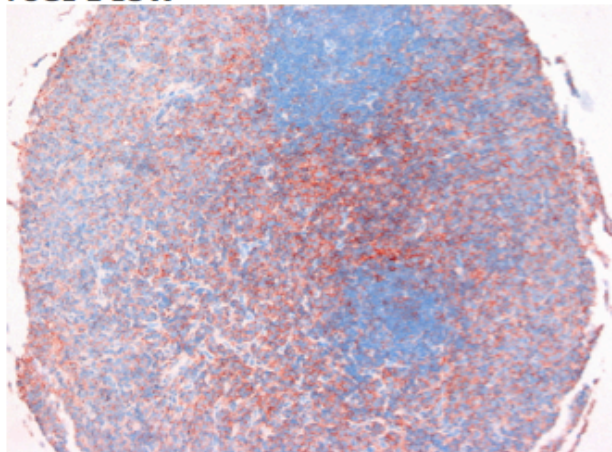
Immagini: CD44 e CD162 (PSGL-1).

Casistica; TMA Ptcl-Nos; TMA Ptcl ; Biopsia Epatica Linfoma Epatoesplenico Gamma Delta (HSTL).



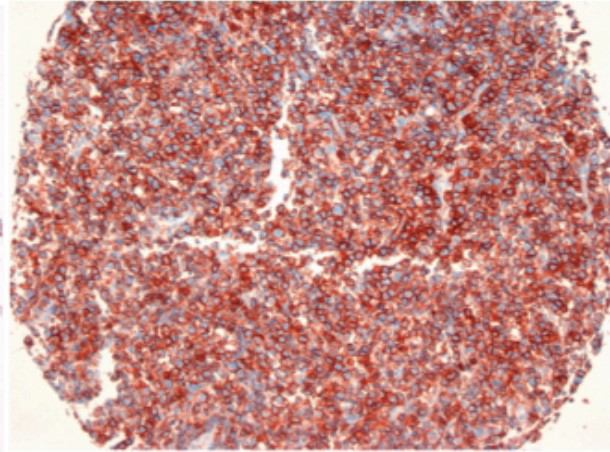


**PSGL-1 LOW**

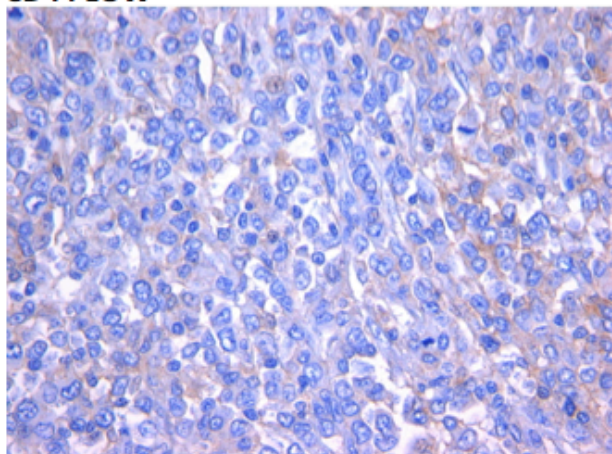


**TMA PTCL ALCL**

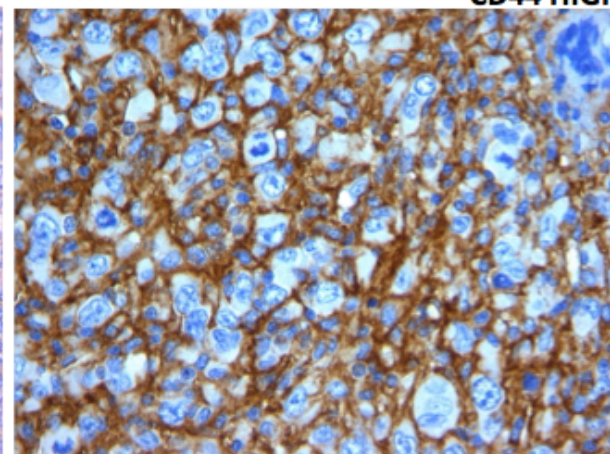
**PSGL-1 HIGH**



**CD44 LOW**

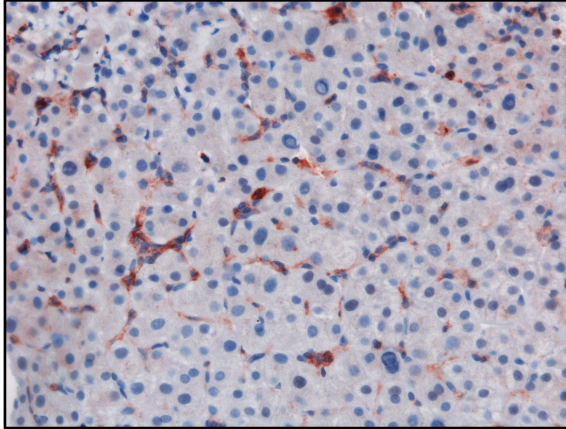


**CD44 HIGH**



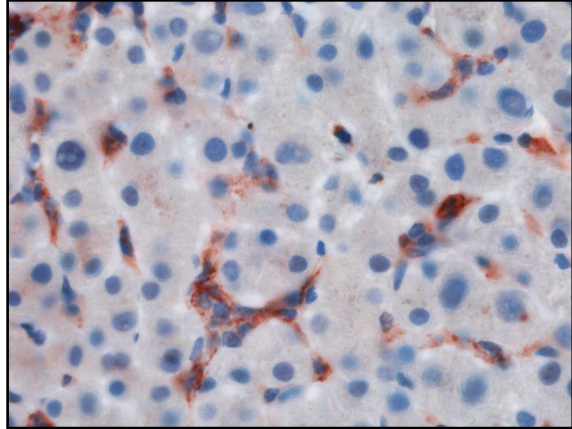
Immagini Linfomi T Gamma Delta (HSTL). Biopsia Epatica. CD44 E PSGL-1

PSGL-1 20X

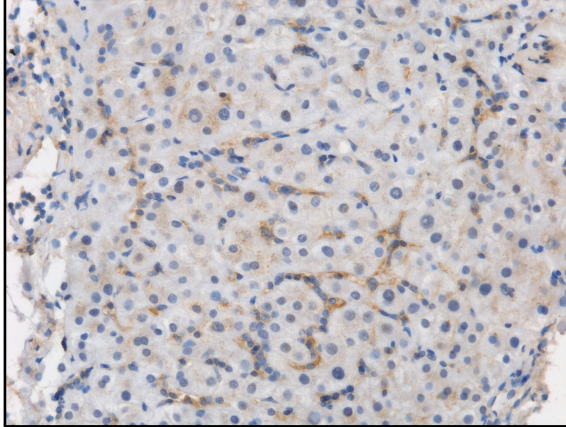


**BIOPSIA EPATICA HSTL**

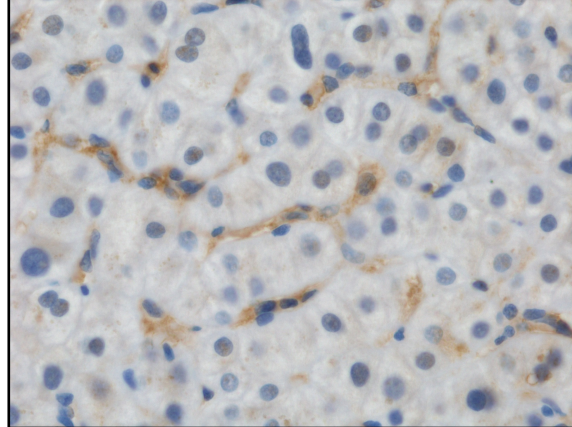
PSGL-1 40X



CD44 20X

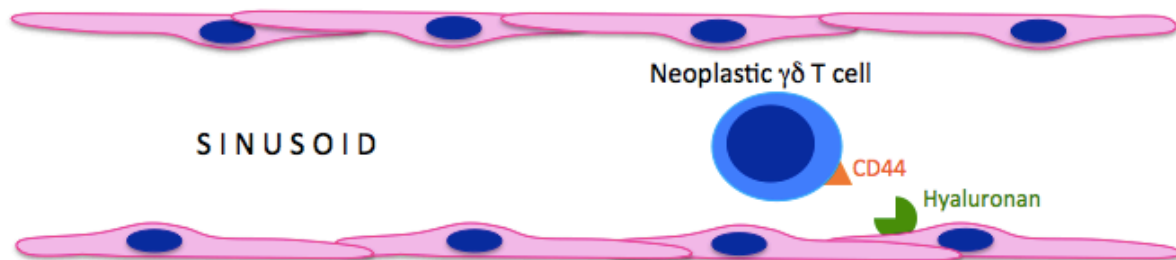
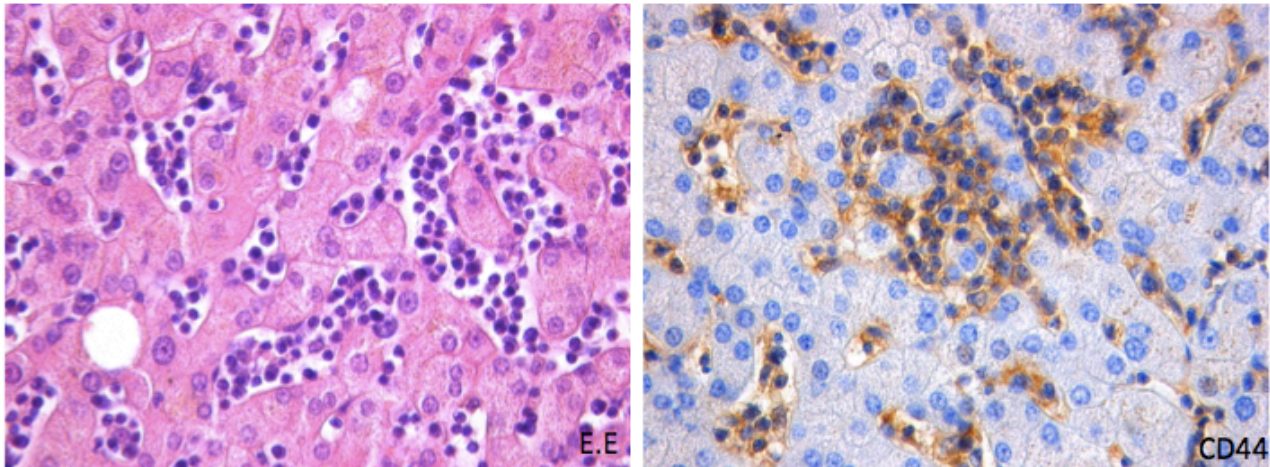


CD44 40X





## RESECATO EPATICO HSTL



Una volta validato il dato di espressione in situ, si è proceduto all'allestimento di colture cellulari al fine di mimare il microambiente stromale valutando l'attività delle interazioni tra la componente linfocitaria e la controparte endoteliale.

Le colture hanno riguardato Linfociti T gamma delta prelevati da paziente sani posti in coltura con cellule endoteliali (Huvec), Dischetti di Acido Ialuronico, Osteopontina, e i soli gamma delta come controllo. Si è valutata l'attivazione, in termini di produzione di CD69 e IL-17, e la proliferazione e vitalità, attraverso Ki67 (Mib-1) e Test Annessina Propidio.

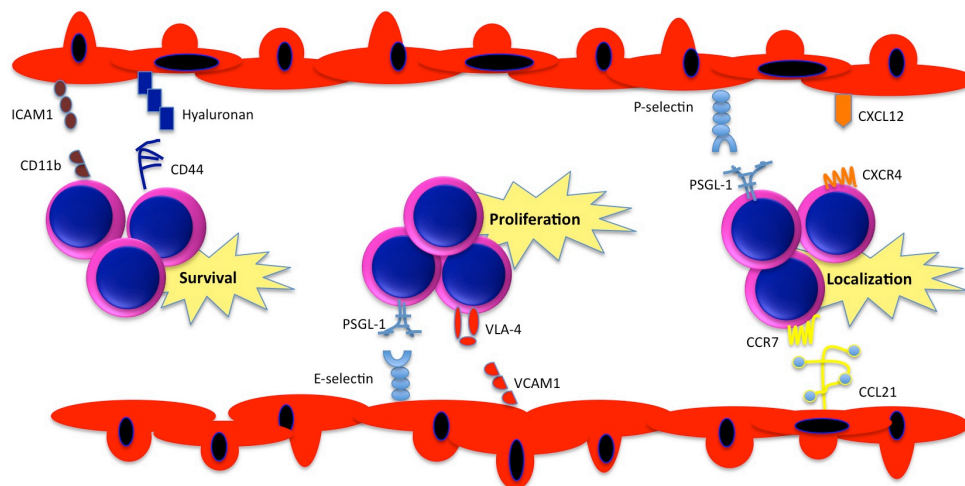
Immagine della Review pubblicata nel 2014 durante il mio periodo di Dottorato presso il Dipartimento di Anatomia Patologica, nel Laboratorio di Ricerca di Immunologia Dei Tumori, diretto dal Prof. Claudio Tripodo.

REVIEW ARTICLE

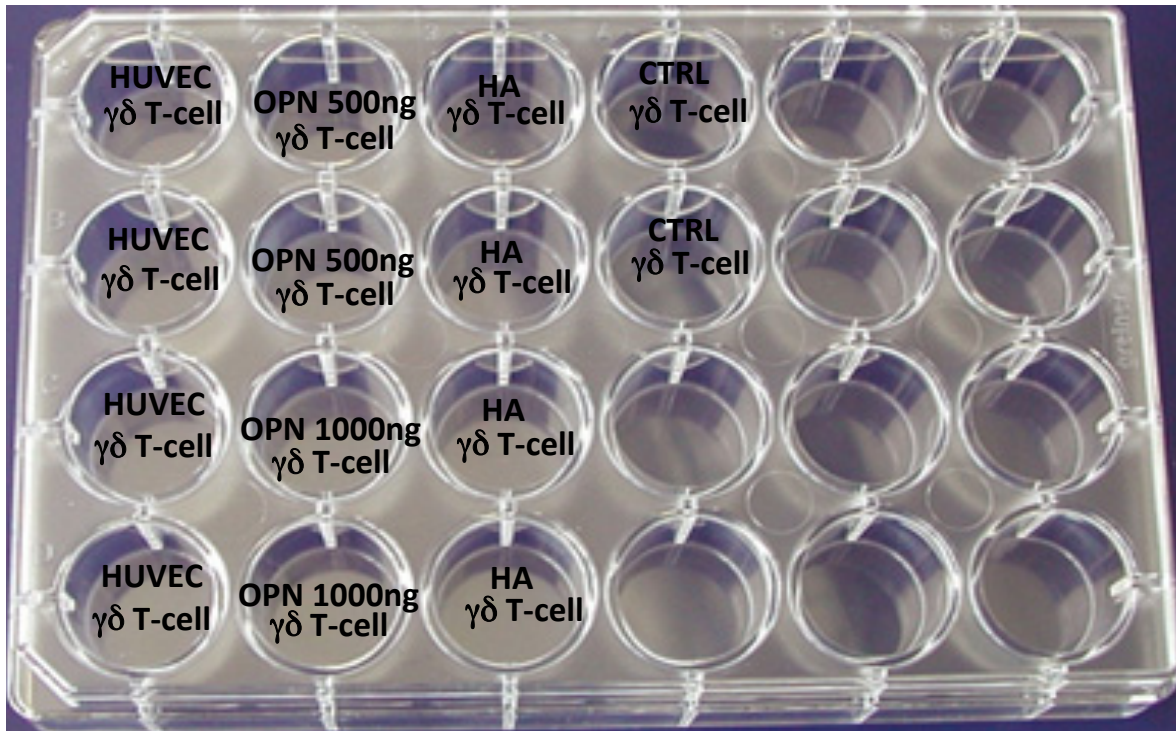
## Challenges and new prospects in hepatosplenic $\gamma\delta$ T-cell lymphoma

Marco Calvaruso<sup>1</sup>, Alessandro Gulino<sup>2</sup>, Salvatore Buffa<sup>2</sup>, Carla Guarnotta<sup>2</sup>, Giovanni Franco<sup>3</sup>,  
Matilde Cacciatore<sup>4</sup>, Maria Grazia Bonura<sup>2</sup>, Vito Franco<sup>2</sup> & Ada Maria Florena<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Tecnologie Oncologiche – HSR Giglio, C. da Pietrapollastra-Pisciotta, Cefalù, Italy, <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze per la Promozione della Salute e Materno Infantile and <sup>3</sup>Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica – UO. di Ematologia, Università di Palermo, Palermo, Italy and <sup>4</sup>Unità Operativa di Anatomia, Istologia Patologica, Citodiagnostica e Citogenetica, Azienda Unita' Locale Socio – Sanitaria N.9 Di Treviso, Treviso, Italy



## Experimental Design



Popolazione Omogenea Purezza del 96% dopo isolamento immunomagnetico

Huvec → 50000

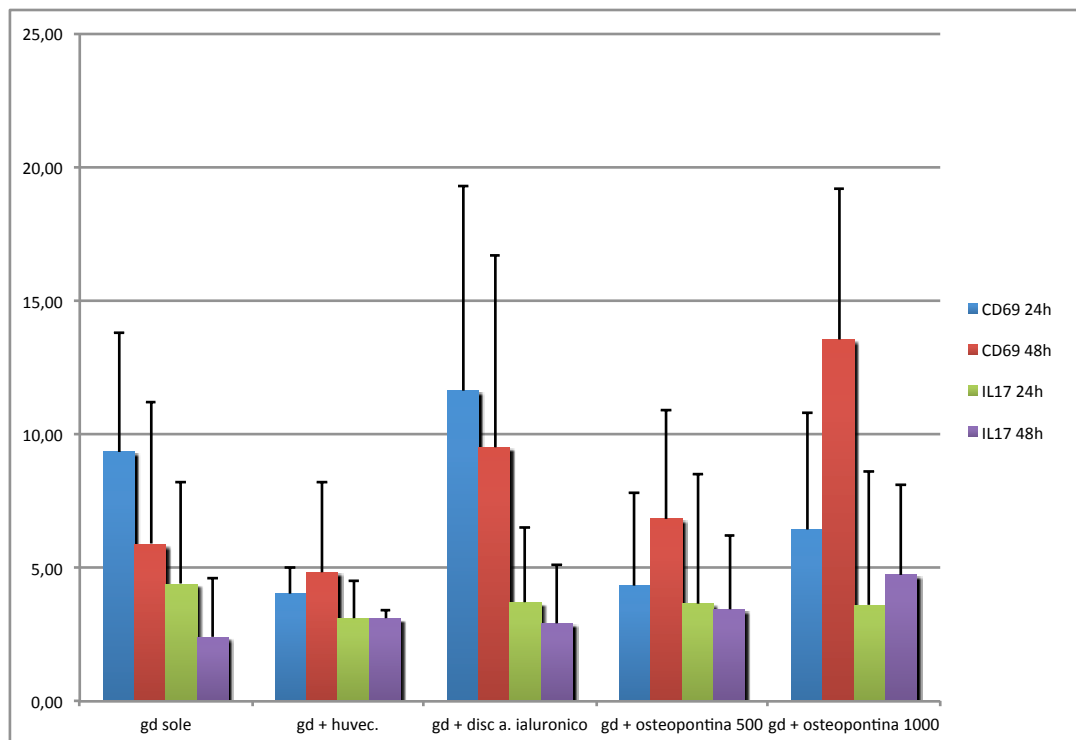
GD Linf →  $250-300 \times 10^5$

Dischetti di Acido Ialuronico

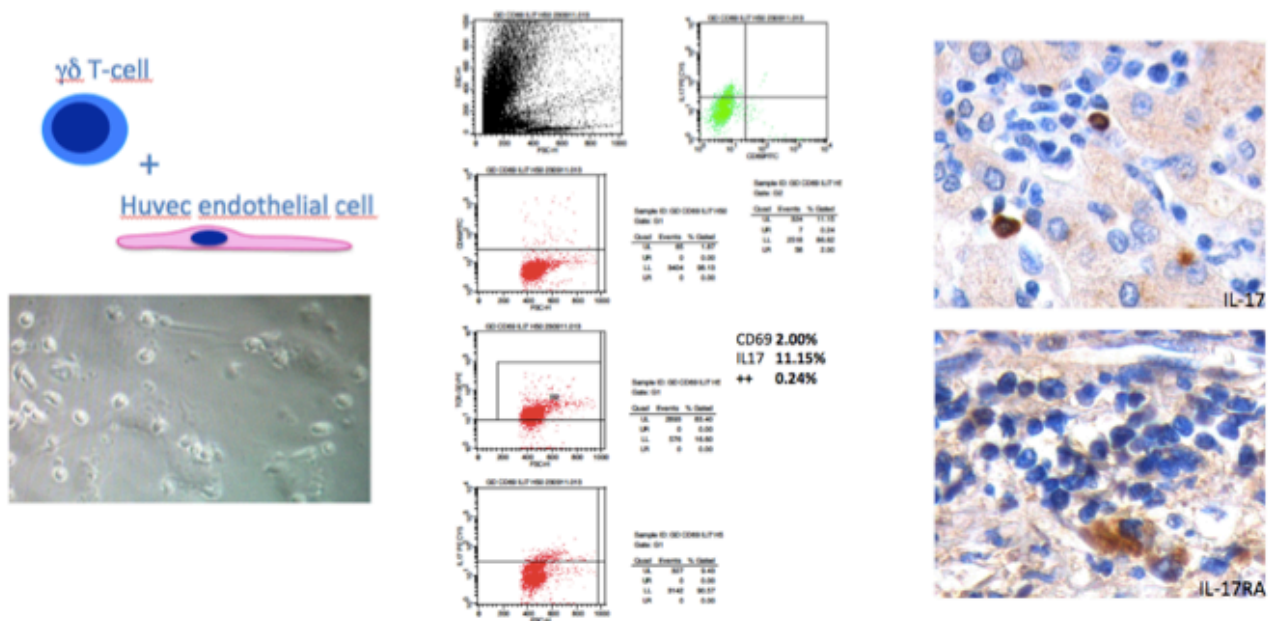
Osteopontina a 500 e 1000 nanogrammi.

Le Colture cellulari sono state eseguite 3 volte al fine di avere un dato riproducibile, le letture eseguite al FACS dopo marcatura con i rispettivi anticorpi, riguardano l'attivazione dopo 24/48ore, (CD69 / IL-17), e la vitalità (Test Annessina Propidio) e proliferazione (Ki-67 (Mib-1) a 48 ore e a 5 giorni.

## ATTIVAZIONE



Esperimenti a 24-48 hrs in cui valutiamo, l'attivazione dei linfociti T ( $\gamma\delta$ ), attraverso l'espressione del CD69 e la produzione di Interleuchina 17: alle 24 ore abbiamo notato un'attivazione importante (CD69) nella condizione con i dischetti di Acido Ialuronico rispetto alle sole gamma delta. Alle 48 ore in termini di attivazione (CD69), notiamo oltre alla condizione con i dischetti di Acido Ialuronico anche la condizione con i diversi quantitativi di Osteopontina rispetto alle sole gamma delta. Alle 24 ore notiamo uno shift verso la produzione di Interleuchina (IL-17), che si mantiene costante nelle diverse condizioni, anche se leggermente superiore nella condizione dei soli gamma delta. La produzione di Interleuchina (IL-17) alle 48 ore si è mantenuta più alta rispetto ai soli gamma delta, nella condizione in presenza di Huvec, con i dischetti di Acido Ialuronico e con l'Osteopontina.



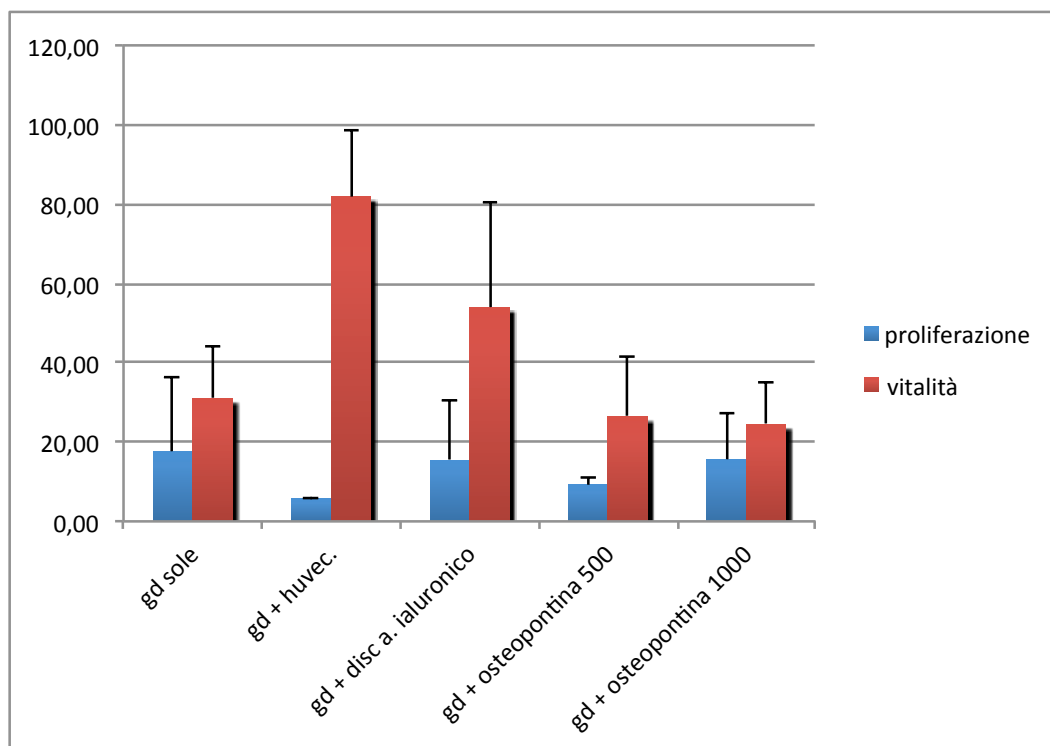
L'espressione dell'Interleuchina 17 è stata confermata in situ su un resecato Epatico di un paziente con Linfoma Epatosplenico. Oltre all'interleuchina 17 prodotta dai Linfociti T nel contesto della nicchia vascolare, ho riscontrato anche l'espressione del suo recettore espresso sulla superficie dei Macrofagi, testimoniando la presenza di un loop infiammatorio. A 48 ore e a 5 giorni è stata valutata la proliferazione attraverso marcatura con il Ki67 (Mib-1), e la vitalità con il test dell'Annessina Propidio.



## PROLIFERAZIONE / VITALITA'

Proliferazione : Ki67 (Mib-1)

Vitalità : Test Annessina Propidio



Dopo 5 giorni di colture cellulari sono state valutate la proliferazione e la vitalità. Proliferazione valutata attraverso l'espressione del Ki67(Mib-1) a 48h: Leggero aumento in risposta alla presenza dei dischetti di Acido Ialuronico e di Osteopontina.

Apoptosi valutata attraverso il Test dell'Annessina Propidio a 48h: Diminuita in presenza di Huvec ed in presenza dei dischetti di Acido Ialuronico.

Esperimenti a 5 gg in cui viene valutata la Proliferazione e la Vitalità:

Proliferazione: Leggermente aumentata in presenza dei Dischetti di Acido Ialuronico e di Osteopontina a 1000 nanogrammi, rispetto alle sole Gamma Delta che risultano, dopo 5 giorni vitali.

Vitalità attraverso il Test dell' Annessina Propidio: Le cellule gamma delta più vitali risultano quelle in co-coltura con le cellule Huvec e con i dischetti di Acido Ialuronico, seguite dalle sole gamma Delta e da quelle con l'Osteopontina senza nessuna significativa differenza nonostante le diverse condizioni.

I risultati ottenuti dimostrano il contributo della componente endoteliale, rappresentato dalle Huvec, come fattore di attivazione e dell'Acido Ialuronico come fonte strutturale e di stimolo per il CD44 presente sul linfocita T gamma delta.



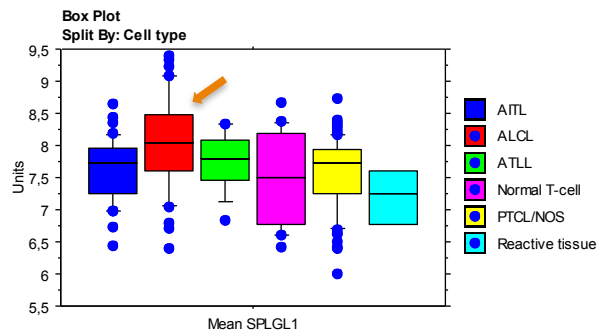
In quest'ultimo anno siamo riusciti, in collaborazione con l'Unità di Immunologia Molecolare della Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori di Milano, Diretta dal Dott. Mario Paolo Colombo, a mettere su un modello Xenograft di Linfoma Anaplastico a grandi Cellule T da linee Umane di Linfoma T (SUDHL-1, KARPASS 299). Lo sviluppo di questo modello è stato fondamentale per poter verificare l'espressione di marcatori, CD44 e PSGL-1, da utilizzare in futuro nella pratica clinica, e per valutare successivamente l'efficacia di Anticorpi Bloccanti o Agonisti gli assi d'interazione del CD44 e del PSGL-1 (CD162), con i suoi ligandi endoteliali.

L'idea del modello nasce dopo aver condotto studi di GEP (Gene Expression Profiling), che hanno evidenziato, nell'ambito dei PTCL, una maggiore espressione in termini di prodotto proteico del PSGL-1 nel Linfoma Anaplastico a grandi cellule T.

Gli studi di GEP ( Gene Expression Profiling), sono stati condotti in collaborazione con il Prof. Pier Paolo Piccaluga del Dipartimento di Ematologia e Scienze Oncologiche "L. e A. Seràgnoli" dell'Università di Bologna.

# CD162 expression

## ANOVA by cell type – All cases



Fisher's PLSD for Mean SPLGL1  
Effect: Cell type  
Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
ATIL, ALCL	-.428	.270	.0021	S
ATIL, ATLL	-.139	.375	.4671	
ATIL, Normal T-cell	.141	.322	.3873	
ATIL, PTCL/NOS	.021	.235	.8633	
ATIL, Reactive tissue	.425	.617	.1754	
ALCL, ATLL	.289	.380	.1355	
ALCL, Normal T-cell	.569	.328	.0008	S
ALCL, PTCL/NOS	.448	.243	.0004	S
ALCL, Reactive tissue	.853	.620	.0073	S
ATLL, Normal T-cell	.280	.419	.1888	
ATLL, PTCL/NOS	.159	.356	.3793	
ATLL, Reactive tissue	.564	.672	.0998	
Normal T-cell, PTCL/NOS	-.121	.300	.4270	
Normal T-cell, Reactive tissue	.284	.644	.3858	
PTCL/NOS, Reactive tissue	.405	.605	.1888	

ANOVA Table for Mean SPLGL1

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Cell type	5	7,277	1,455	4,101	.0015	20,503	.959
Residual	174	61,758	.355				

Means Table for Mean SPLGL1

Effect: Cell type

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
ATIL	40	7,612	.493	.078
ALCL	36	8,040	.739	.123
ATLL	13	7,751	.449	.125
Normal T-cell	20	7,471	.713	.159
PTCL/NOS	67	7,592	.555	.068
Reactive tissue	4	7,187	.499	.250

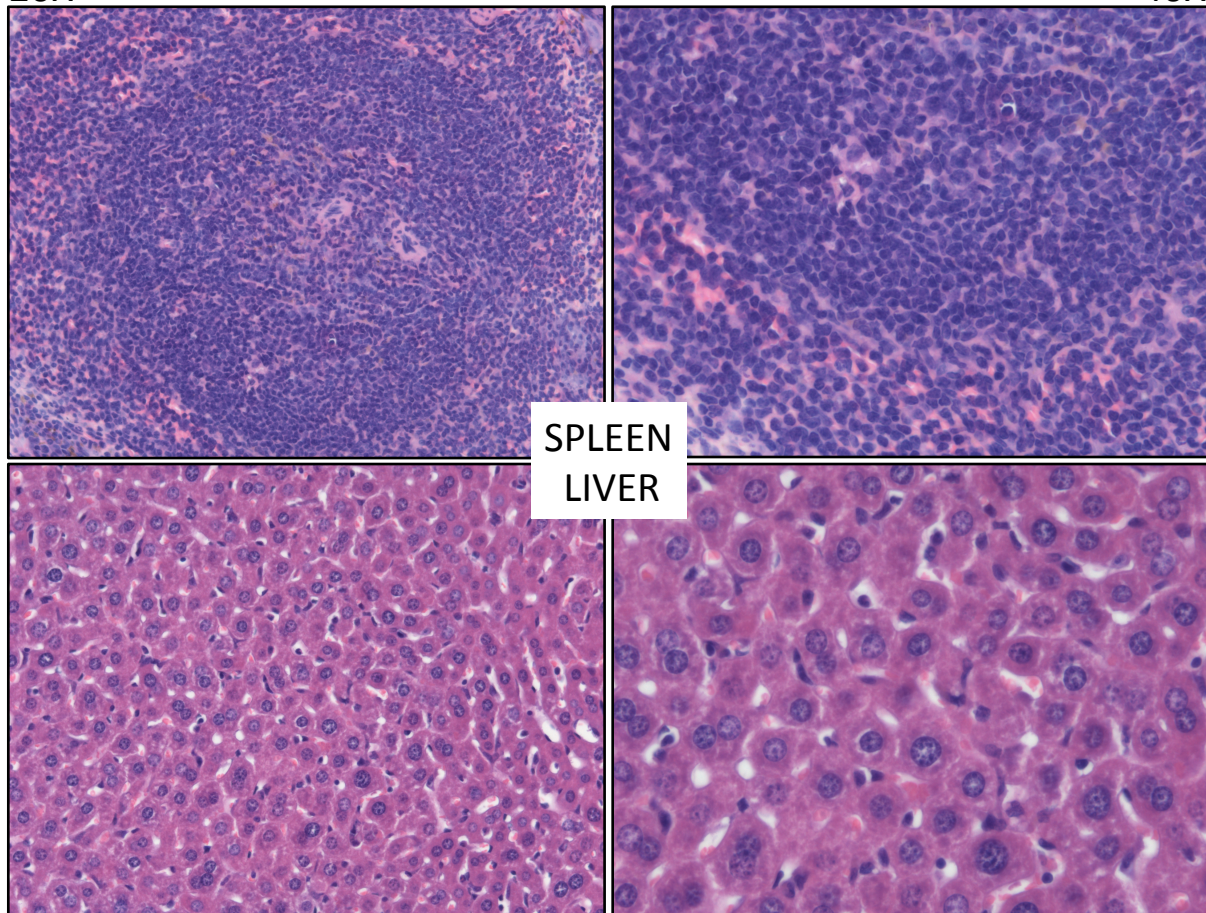
Una volta sacrificato l'animale sono stati prelevati gli organi; Cuore, Polmone, Reni, Fegato, Milza, Linfonodi. Gli organi dopo essere stati Campionati, Processati ed Inclusi in blocchetti di paraffina sono stati tagliati e posti su vetrino per effettuare le indagini istochimiche ed immunoistochimiche. Sono state allestite sezioni dello spessore di 3  $\mu$ m, al fine di valutare l'aspetto morfologico attraverso le classiche colorazioni istochimiche in Ematossilina Eosina e sezioni dello spessore di 3  $\mu$ m, per effettuare indagini immunoistochimiche utili alle nostre indagini sperimentali

Colorazioni Istologiche Ematossilina Eosina: Parenchima Splenico e Parenchima Epatico

20X

EMATOSSILINA EOSINA MODELLO XENOGRAFT ALCL

40X



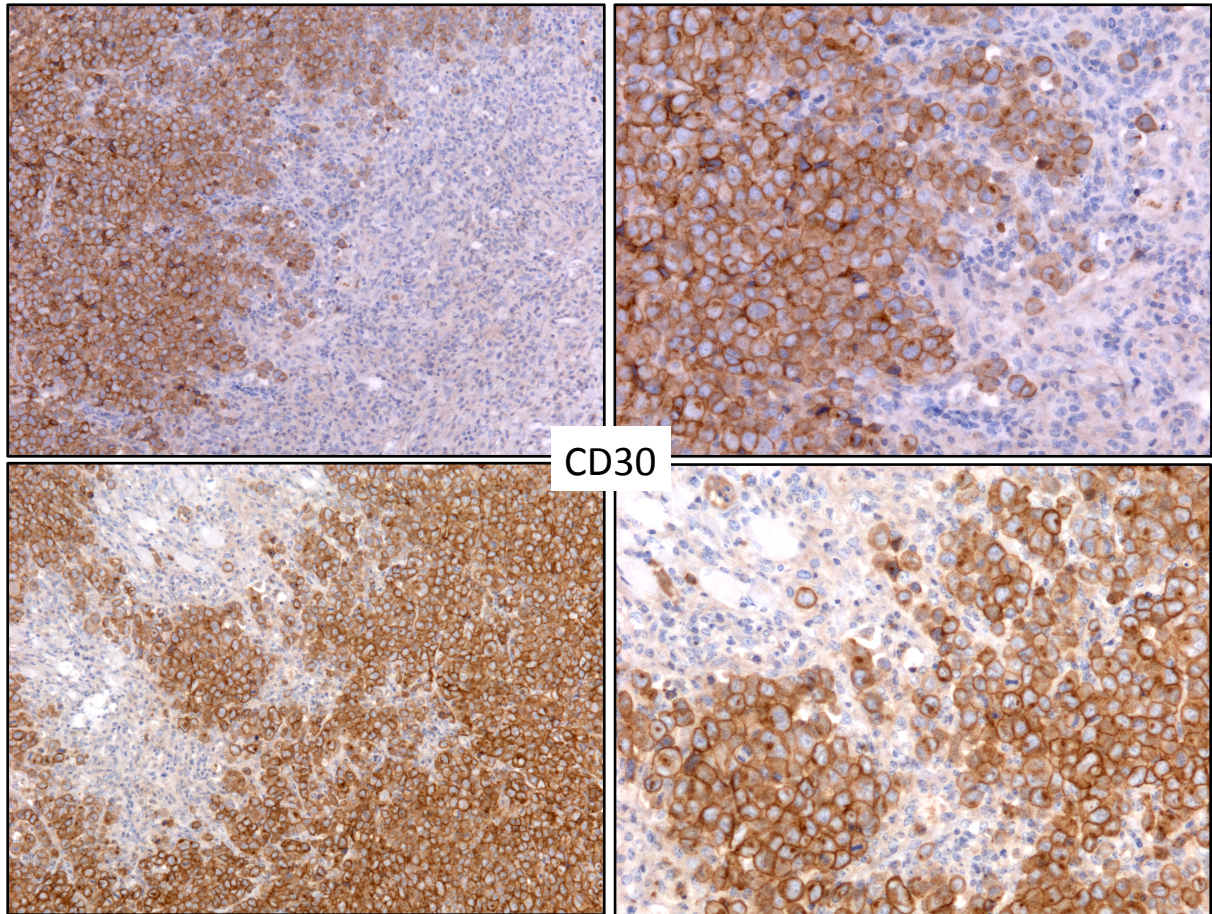


Colorazioni IHC (CD30), molecola cardine nei Linfomi Anaplastici a grandi cellule T

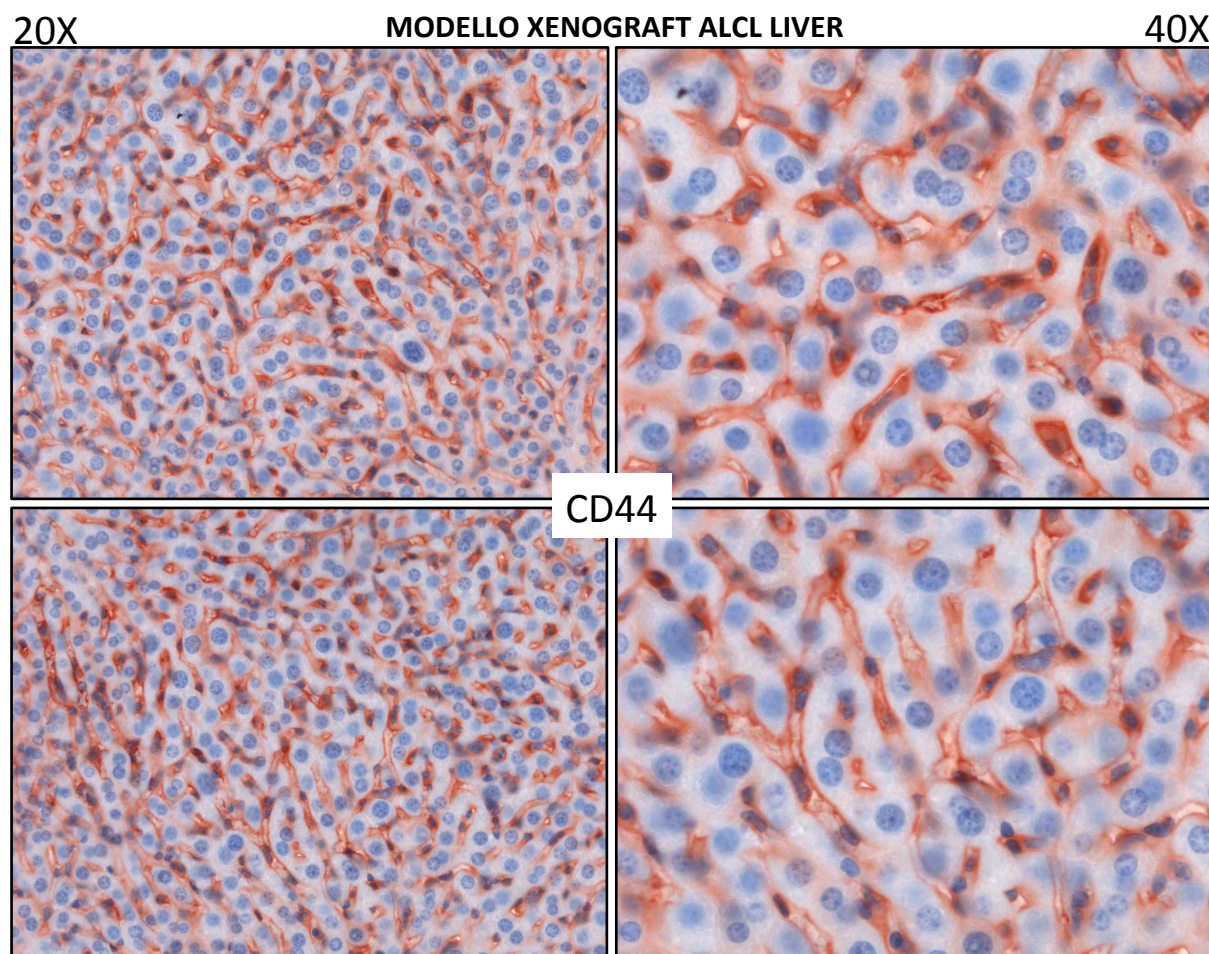
20X

MODELLO XENOGRAFT ALCL LINFONODO

40X

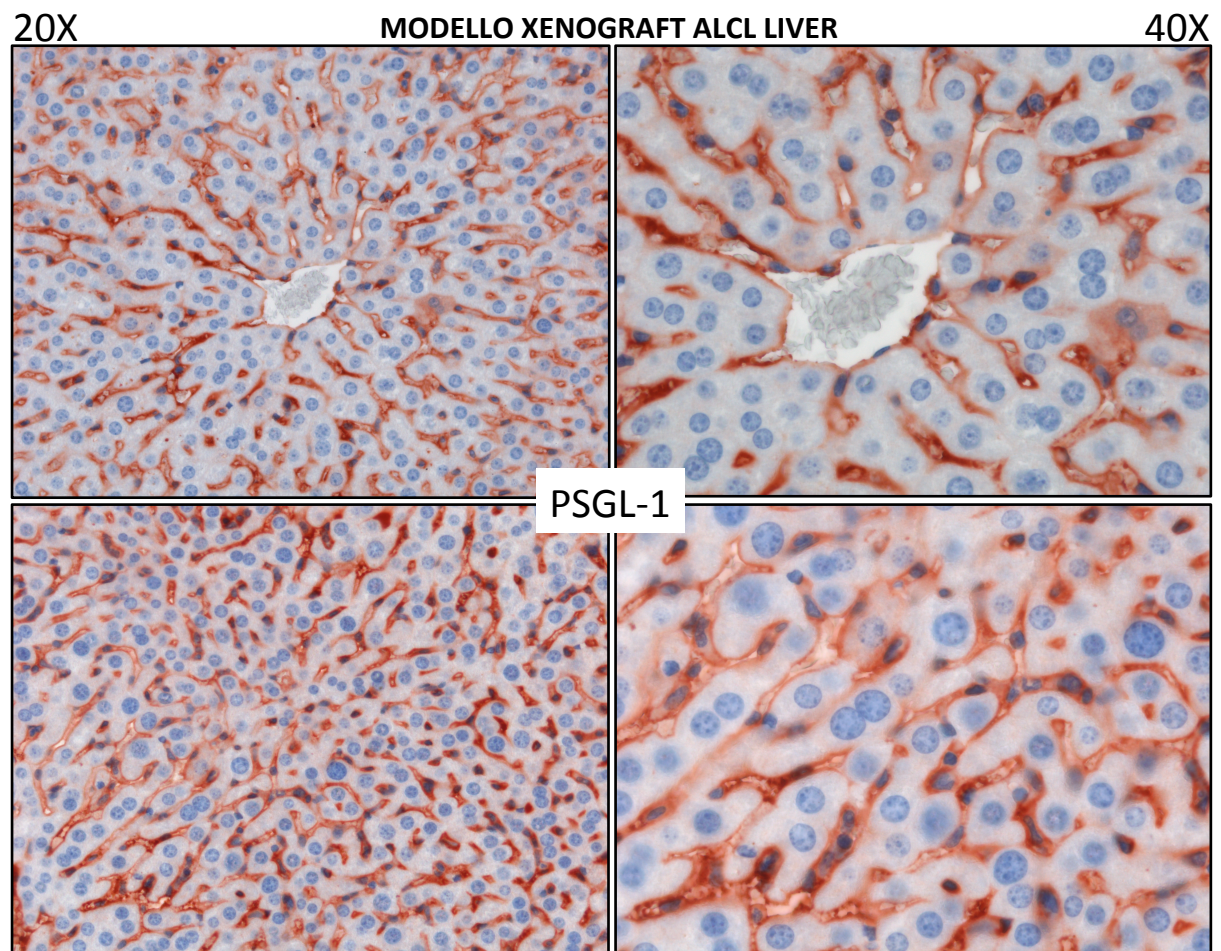


Espressione in situ del CD44 nel contesto del Parenchima Epatico





Espressione in situ del PSGL-1 nel contesto del Parenchima Epatico



## Conclusioni

Recenti evidenze sperimentali verificatesi nel corso degli ultimi anni in ambito immunologico e biotecnologico hanno consentito l'acquisizione di nuove strategie terapeutiche, rappresentate dall'uso farmacologico degli anticorpi monoclonali (MoAb). Tali molecole sono in grado di indurre una modificazione della risposta biologica, sia attivando le componenti cellulari ed umorali del sistema immune, sia riconoscendo e bloccando molecole, chiamate antigeni, la cui espressione o iperespressione rappresenta una caratteristica della cellula tumorale. L'effetto degli anticorpi monoclonali, nell'ambito della terapia antitumorale, si espleta attraverso diversi meccanismi d'azione. Un primo meccanismo, chiamato Citotossicità Complemento Dipendente (Complement Dependent Cytotoxicity - CDC), prevede l'intervento del Sistema del Complemento (C), il principale effettore della branca umorale dell'immunità innata, che attraverso la clusterizzazione delle sue componenti è in grado di lisare e mediare l'eliminazione di un agente patogeno bersaglio svolgendo così un ruolo protettivo nei confronti dell'organismo ospite [38]. Un secondo meccanismo chiamato, Citotossicità Cellulare Anticorpo- Dipendente (Antibody Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity – ADCC) è promosso dall'interazione della porzione costante Fc dell'anticorpo (a sua volta legato all'antigene della cellula bersaglio) con i recettori per Fc (FcR) espressi su un'ampia varietà di cellule. Un terzo ed ultimo meccanismo chiamato Apoptosi, causa la morte diretta della cellula tumorale; tale processo risponde a un preciso programma genico coinvolto nell'omeostasi fisiologica tissutale. L'utilizzo degli anticorpi monoclonali varia in relazione al tipo di neoplasia e ciò si traduce direttamente nella necessità di scegliere in modo appropriato le classi di pazienti che possono trarre maggior beneficio da questo tipo di approccio terapeutico. Nell'ambito delle patologie neoplastiche, in particolare, l'utilizzo di MoAb è spesso associato all'impiego di terapie tradizionali come la chemioterapia e/o la radioterapia. Le neoplasie ematologiche rappresentano un modello adeguato per lo studio dell'efficacia del trattamento con MoAb, essendo caratterizzate dalla presenza di cellule circolanti nel sangue periferico e quindi facilmente raggiungibili dai MoAb. Inoltre, le cellule neoplastiche di derivazione emopoietica esprimono un ricco repertorio di antigeni di superficie corrispondenti al particolare stadio differenziativo della controparte cellulare (mieloide o linfoide) da cui traggono origine. Questo profilo immuno-fenotipico comprende numerosi marcatori candidabili quali bersagli di immunoterapia umorale.

Un esempio peculiare dell'utilizzo di MoAb nell'ambito della terapia delle neoplasie linfoidi B-cellulari è dato dal Rituximab, un anticorpo anti-CD20 approvato dalla FDA (Food and Drug Administration) nel 1997. Il CD20 è stato il primo antigene tumore-associato ad essere utilizzato ai fini terapeutici, in quanto notevolmente espresso su linfociti B maturi normali e neoplastici, ma non

su cellule staminali emopoietiche, su plasmacellule secernenti anticorpi o in altri tessuti normali [39,40]. La selettiva espressione del CD20 nelle componenti B linfocitarie mature consente al Rituximab di esercitare la sua azione terapeutica sui linfociti neoplastici, preservando i precursori responsabili della corretta ripopolazione delle cellule B normali [41]. Tale anticorpo ha cambiato radicalmente la prognosi e l'approccio terapeutico di molti linfomi di origine B-cellulare.

Visti i successi ottenuti mediante l'utilizzo di MoAb nell'ambito dei linfomi B, un analogo approccio andrebbe perseguito anche nel contesto dei linfomi T. Ad oggi, l'unico target antigenico adottato per l'immunoterapia anticorpo-mediata dei linfomi T è il CD52, un antigene tumore-associato bersaglio dell'anticorpo Campath, approvato nel 2001 dalla FDA (Food and Drug Administration), per il trattamento della leucemia linfatica cronica (LLC) [42]. L'utilizzo di questo anticorpo monoclonale non ha tuttavia ottenuto risultati promettenti nei linfomi periferici a cellule T (PTCL). Ciò è probabilmente imputabile al fatto che l'espressione di CD52 è molto variabile e spesso modesta sulla superficie delle cellule linfomatose. Nasce così la necessità di individuare un antigene espresso sulla superficie del clone neoplastico di linfomi T, che mostri una distribuzione omogenea ed una specificità tissutale tale da giocare un ruolo fondamentale nella sua candidatura a possibile target terapeutico. Alla luce dei risultati ottenuti nell'ambito dei PTCL, sarebbe auspicabile valutare l'effettivo ruolo del CD44 e del CD162 (PSGL-1) come possibili target terapeutici da affiancare ai tradizionali approcci chemioterapici.

Sulla base di quanto detto, ci riproponiamo di proseguire con ulteriori analisi e con un'approfondita caratterizzazione del Modello murino per comprendere con maggiore chiarezza le dinamiche che contraddistinguono i PTCL e finalizzare il lavoro svolto in un prodotto scientifico.

## Ringraziamenti

Ringrazio L'Istituto di Anatomia Patologica del "Dipartimento di Scienze per la Promozione della Salute e Materno Infantile", che mi ha ospitato durante questo percorso formativo e il mio Tutor, la Professoressa Ada Maria Florena.

Ringrazio sentitamente il gruppo del Laboratorio di Immunologia dei Tumori e in particolar modo il Prof. Claudio Tripodo per il supporto sempre attento e preciso che ha saputo darmi.

Ringrazio inoltre il Dott. Fabio Salvatore Palumbo, del Laboratorio di Polimeri Biocompatibili del Dipartimento STEBICEF dell'Università degli Studi di Palermo diretto dalla Professoressa Giovanna Pitarresi, per avermi fornito i Dischetti di Acido Ialuronico, essenziali per l'attuazione del Disegno Sperimentale.

Ringrazio i Laboratori dell'Unità Operativa Complessa CLADIBIOR (Central Laboratory of Advanced Diagnosis and Biomedical Research), diretto dal Prof. Francesco Dieli, con l'ausilio del



Dott. Marco Pio La Manna per aver messo a disposizione la strumentazione utile all'allestimento delle colture cellulari e alle analisi citofluorimetriche.

Un sentito ringraziamento va all'Unità di Immunologia Molecolare dell'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano diretto dal Dott. Mario Paolo Colombo; in particolare la Dott.ssa Mariella Parenza, la Dott.ssa Sabina Sangaletti, la Dott.ssa Silvia Miotti per avermi sostenuto e guidato nell'allestimento delle linee cellulari Tumorali e nel conseguente sviluppo del modello Xenograft di Linfoma ALCL, con la supervisione del Dott. Colombo.

Ringrazio il Prof. Pier Paolo Piccaluga del Dipartimento di Ematologia e Scienze Oncologiche "L. e A. Seràgnoli" dell'Università di Bologna, per aver messo a disposizione un'ampia casistica e per aver condotto gli studi di GEP, preziosi per l'avanzamento del progetto.

Ringrazio il Dott. Paolo Macor e la Dott.ssa Roberta Bulla dell'Università degli Studi di Trieste, per i consigli e per avermi concesso le cellule Endoteliali (Huvec).

## Bibliografia:

- 1:Vose J, Armitage J, Weisenburger D; International T-Cell Lymphoma Project. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol*. 2008 Sep 1;26(25):4124-30.
- 2:SA. Pileri, C. Agostinelli, C. Campidelli, F.Bacci, E. Sabattini, A. Pileri Jr, P.P. Piccaluga. Peripheral T-cell lymphomas. *Hematology Meeting Report* 2008;2(5):33-38.
- 3:Tripodo C, Iannitto E, Florena AM, Pucillo CE, Piccaluga PP, Franco V, Pileri SA. Gamma-delta T-cell lymphomas. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Dec;6(12):707-17. Epub 2009 Nov 10.
- 4:Ferreri AJ, Govi S, Pileri SA. Hepatosplenic gamma-delta T-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012 Aug;83(2):283-92
- 5:Siegel CA, Marden SM, Persing SM, Larson RJ, Sands BE. Risk of lymphoma associated with combination anti-tumor necrosis factor and immunomodulator therapy for the treatment of Crohn's disease: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009 Aug;7(8):874-81..
- 6:Farcet JP, Gaulard P, Marolleau JP, Le Couedic JP, Henni T, Gourdin MF, Divine M, Haioun C, Zafrani S, Goossens M, et al. Hepatosplenic T cell lymphoma: sinusal/sinusoidal localization of malignant cells expressing the T-cell receptor gamma delta. *Blood*. 1990 Jun 1;75(11):2213-9.
- 7:Sallah S, Smith SV, Lony LC, Woodard P, Schmitz JL, Folds JD. Gamma/delta T-cell hepatosplenic lymphoma: review of the literature, diagnosis by flow cytometry and concomitant autoimmune hemolytic anemia. *Ann Hematol*. 1997 Mar;74(3):139-42. Review.
- 8:Belhadj K, Reyes F, Farcet JP, Tilly H, Bastard C, Angonin R, Deconinck E, Charlotte F, Leblond V, Labouyrie E, Lederlin P, Emile JF, Delmas-Marsalet B, Arnulf B, Zafrani ES, Gaulard P. Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma is a rare clinicopathologic entity with poor outcome: report on a series of 21 patients. *Blood*. 2003 Dec 15;102(13):4261-9. (2)
- 9:Weidmann E. Hepatosplenic T cell lymphoma. A review on 45 cases since the first report describing the disease as a distinct lymphoma entity in 1990. *Leukemia*. 2000 Jun;14(6):991-7.

- 10:Iannitto E, Tripodo C. How I diagnose and treat splenic lymphomas. *Blood*. 2011 Mar 3;117(9):2585-95.
- 11:Tamaska J, Adam E, Kozma A, Gopcsa L, Andrikovics H, Tordai A, Halm G, Bereczki L, Bagdi E, Krenacs L. Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma with ring chromosome 7, an isochromosome 7q equivalent clonal chromosomal aberration. *Virchows Arch*. 2006 Oct;449(4):479-83.
- 12:Yago T, Shao B, Miner JJ, Yao L, Klopocki AG, Maeda K, Coggeshall KM, McEver RP. E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin alphaLbeta2-mediated slow leukocyte rolling. *Blood*. 2010 Jul 22;116(3):485-94.
- 13:Edwards S, Lalor PF, Nash GB, Rainger GE, Adams DH. Lymphocyte traffic through sinusoidal endothelial cells is regulated by hepatocytes. *Hepatology*. 2005 Mar;41(3):451-9.
- 14:Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G and Kallioniemi OP: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens *Nat Med* 1998, 4:844- 847.
- 15:Palumbo F.S, Pitarresi G, Fiorica C, Matricardi P, Albanese A, Giammona G (2012). In situ forming hydrogels of new amino hyaluronic acid/benzoyl-cysteine derivatives as potential scaffolds for cartilage regeneration. *SOFT MATTER*, vol. 8, p. 4918-4927, ISSN: 1744-683X, doi: 10.1039/c2sm07310b 2012 - Brevetto Soft Matter, 2012, 8, 4918)
- 16:Giammona G, Palumbo F.S, Pitarresi G (2008). Procedimento per la produzione di Derivati Funzionalizzati dell'Acido Ialuronico e Relativi Idrogeli. RM2008A000636 2008 *Journal of Materials Biomedical Research parte A* 84A 2008, 2, 413 -424)
- 17:Fischer P, Nacheva E, Mason DY, Sherrington PD, Hoyle C, Hayhoe FG, Karpas A. A Ki-1 (CD30)-positive human cell line (Karpas 299) established from a high-grade non-Hodgkin's lymphoma, showing a 2;5 translocation and rearrangement of the T-cell receptor beta-chain gene. *Blood*. 1988 Jul;72(1):234-40.

- 18: Epstein AL, Kaplan HS. Biology of the human malignant lymphomas. I. Establishment in continuous cell culture and heterotransplantation of diffuse histiocytic lymphomas. *Cancer*. 1974 Dec;34(6):1851-72.
- 19: Stamenkovic I, Yu Q. Shedding light on proteolytic cleavage of CD44: the responsible sheddase and functional significance of shedding. *J Invest Dermatol*. 2009 Jun;129(6):1321-4.
- 20: Hall CL, Wang FS, Turley E. Src-/- fibroblasts are defective in their ability to disassemble focal adhesions in response to phorbol ester/hyaluronan treatment. *Cell Commun Adhes*. 2002 Sep-Dec;9(5-6):273-83.
- 21: Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2002 Nov;39(6):527-79. Review.
- 22: Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*. 1990 Jun 29;61(7).
- 23: Marhaba R, Zöller M. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol*. 2004 Mar;35(3):211-31. Review.
- 24: Zagorianakou N, Stefanou D, Makrydimas G, Zagorianakou P, Briasoulis E, Karavasilis B, Agnantis NJ. CD44s expression, in benign, borderline and malignant tumors of ovarian surface epithelium. Correlation with p53, steroid receptor status, proliferative indices (PCNA, MIB1) and survival. *Anticancer Res*. 2004 May-Jun;24(3a):1665-70.
- 25: Lesley J, Kincade PW, Hyman R. Antibody-induced activation of the hyaluronan receptor function of CD44 requires multivalent binding by antibody. *Eur J Immunol*. 1993 Aug;23(8):1902-9.
- 26: Huet S, Groux H, Caillou B, Valentin H, Prieur AM, Bernard A. CD44 contributes to T cell activation. *J Immunol*. 1989 Aug 1;143(3):798-801.
- 27: Toyama-Sorimachi N, Miyasaka M. A sulfated proteoglycan as a novel ligand for CD44. *J Dermatol*. 1994 Nov;21(11):795-801. Retraction in: *J Dermatol*. 2012 Sep;39(9):822.

- 28: Nagano O, Saya H. "Mechanism and biological significance of CD44 cleavage." *Cancer Sci.*; 95 (12): 930- 5, 2004.
- 29: Ayroldi E, Cannarile L, Migliorati G, Bartoli A, Nicoletti I, Riccardi C, "CD44 (Pgp-1) Inhibits CD3 and Dexamethasone-Induced Apoptosis" *Blood*, Vol.86, No 7: 2672-2678, 1995.
- 30: Gadhoun Z, Leibovitch MP, Qi L, Dumenil D, Durand L, Leibovitch S, Smadja-Joffe F, "CD44: a new means to inhibit acute myeloid leukemia cell proliferation via p27Kip 1", *Blood* ,Vol.103(3),2004.
31. Moore KL, Eaton SE, Lyson DE, et al., The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N- acetylactosamine, *J Bio Chem* 1994, 269: 23318- 23327. (2)
32. Abbal C, Lambelet M, Bartaggia D., et al., Lipid raft adhesion receptors and Syk regulate selectin dependent rolling under flow conditions, *Blood* 2006, 108:3352-3359.
- 33.Chen SC, Huang CC, Chien CL, et al., Cross-linking of P-selectin glycoprotein ligand-1 induces death of activated T cells, *blood* 2004; 104: 3233-3242.
34. Raes G, Ghassabeh GH, Brys L, Mpofu N, Verschueren H, Vanhecke D, De Baetselier P. The metastatic T-cell hybridoma antigen/P-selectin glycoprotein ligand 1 is required for hematogenous metastasis of lymphomas. *Int J Cancer*. 2007 Dec 15;121(12):2646-52.
35. Veerman KM, Williams MJ, Uchimura K, Singer MS, Merzaban JS, Naus S, Carlow DA, Owen P, Rivera-Nieves J, Rosen SD, Ziltener HJ. Interaction of the selectin ligand PSGL-1 with chemokines CCL21 and CCL19 facilitates efficient homing of T cells to secondary lymphoid organs. *Nat Immunol*. 2007 May;8(5):532-9.
36. Nishimura Y, Shimizu H. [Identification of P-selectin glycoprotein ligand-1 as one of the cellular receptors for enterovirus 71]. *Uirusu*. 2009 Dec;59(2):195- 203. Review. Japanese.

37. Tripodo C, Florena AM, Macor P, Di Bernardo A, Porcasi R, Guarnotta C, Ingrao S, Zerilli M, Secco E, Todaro M, Tedesco F, Franco V. P-selectin glycoprotein ligand-1 as a potential target for humoral immunotherapy of multiple myeloma. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009 Aug;9(5):617-25.
- 38: Goldsby RA, Kindt TJ, and Osborne BA *Kuby Immunologia*, 2000.
- 39: Cotran R, Kumar V, and Collins T *Pathologic basis of disease*, Sesta edizione edition: Saunders Company, 1999.
- 40: Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, et al. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* 2000; 95(12): 3900-8.
- 41: Press OW, Leonard JP, Coiffier B, Levy R, and Timmerman J *Immunotherapy of Non-Hodgkin's lymphomas*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2001; 221-40.
- 42: Robak T Alemtuzumab in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *BioDrugs* 2005; 19: 9-22.